

CAROLINE LUISE PROCHASKA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W DO GENE
DA APOLIPOPROTEÍNA A-V COM DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA E DIABETE MELITO TIPO 2**

CURITIBA

2006

CAROLINE LUISE PROCHASKA

**ASSOCIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W DO GENE
DA APOLIPOPROTEÍNA A-V COM DOENÇA ARTERIAL
CORONARIANA E DIABETE MELITO TIPO 2**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marileia Scartezini
Co-orientador: Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza.

CURITIBA

2006

*À minha mãe, Eloisa, por todo
seu amor e carinho e por sempre
me incentivar a estudar.*

CAROLINE LUISE PROCHASKA

Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Farmacêutica Bioquímica da Diagnósticos da América no período de março de 2004 a setembro de 2005, Farmacêutica Bioquímica do Hospital Erasto Gaertner de Curitiba desde março de 2006. Graduada em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná em 2003.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Marileia Scartezini, pelo carinho e preciosa amizade e pelas oportunidades ofertadas nestes dois anos de trabalho.

Ao meu co-orientador, Emanuel Maltempi de Souza, pelo grande apoio e por viabilizar a realização deste trabalho.

Ao professor Geraldo Picheth por conceber a idéia deste projeto, pelo apoio, amizade, disponibilidade em sempre ajudar e por ser um entusiasta da ciência.

À minha família, pelo incentivo e compreensão nos momentos de ausência, em especial à minha mãe Eloisa e aos meus tios Carla e Pedro, obrigada por tudo.

À Mauren Isfer Anghebem Oliveira, obrigada pela presença constante, pelo carinho, incentivo e por ter se tornado uma amiga muito especial.

À minha orientadora de iniciação científica, Maria Suely Soares, pela amizade e por me iniciar nos caminhos da ciência.

Aos meus colegas do Laboratório de Hematologia e Citologia da UFPR, professora Almeriane Weffort Santos, funcionária Irene Ermelino Santos, farmacêuticos bioquímicos Aline Borsato Hauser e Daniel Witchmichen Krukoski pelo auxílio e amizade nos anos de iniciação científica.

À farmacêutica bioquímica, querida amiga, professora e companheira de experimentos Ligia Maria Claro pela amizade e pelos conhecimentos compartilhados.

Às queridas amigas e colegas de mestrado Ângela Florão, Jeanine Marie Nardin e Lisangela Cristina Oliveira, sem vocês eu não teria chegado até aqui.

Aos colegas e pesquisadores do Departamento de Bioquímica da UFPR pela acolhida, auxílio e acesso às instalações do departamento.

À Prof^a Dr^a Eleidi Chautard Freire Maia, do Departamento de Genética da UFPR, pela colaboração com as análises estatísticas.

Ao Hospital Cardiológico Costantini, em especial ao Dr. Costantino Ortiz Costantini, pelo auxílio na seleção dos pacientes e coleta das amostras.

Aos meus amigos da graduação, em especial a Fernanda Santana Ferreira Smolareck, Fernanda Louise Voos, Nathalia Marchiori Iensen, Fernanda Gaensly e André Schenkel Dedecek, obrigada pelo apoio.

Ao meu querido Camilo Batiston Prado, obrigada pela compreensão nos momentos ausentes, pelo carinho, paciência, incentivo e ajuda nas figuras e apresentações.

À coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, seus alunos e professores.

A todas as pessoas que, mesmo não mencionadas, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

*“Aventureiro me chamam aventureiro.
Pois venha um tempo marinheiro
Um vento de aventura.
Altas são as montanhas
E as águas do mar são vastas.”*

Manuel Alegre

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	x
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	2
2.OBJETIVO PRINCIPAL	2
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3 REVISÃO DA LITERATURA	3
3.1 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E DIABETE MELITO.....	3
3.2 LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS.....	6
3.3 APOLIPOPROTEÍNA A-V.....	11
4 MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 DADOS DOS PACIENTES.....	19
4.1.1 Variáveis antropométricas	19
4.1.2 Variáveis bioquímicas.....	19
4.2 REAGENTES.....	20
4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	20
4.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA E IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS DE PCR.	22
4.4.1 Polimorfismo -1131T>C	22
4.4.2 Polimorfismo S19W.....	23
4.5 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO -1131T/C DO GENE DA APO A-V HUMANA.....	25
4.6 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO S19W DO GENE DA APO A-V HUMANA.....	25
4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO.....	26
5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29
6 RESULTADOS	30

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	30
6.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENE DA APO A-V.....	33
6.3 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS E GENÓTIPOS DO GENE DA APO A-V E DAC NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE DM2.....	39
7 DISCUSSÃO.....	43
7.1 DADOS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS.....	43
7.2 VARIABILIDADE GENÉTICA.....	46
7.3 ANÁLISES COMPARATIVAS PARA OS POLIMORFISMO -1131T>C E S19W.....	48
7.4 ESTUDO DE HAPLÓTIPOS.....	51
7.5 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO E OUTRAS COMPARAÇÕES.....	52
8 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS

apo	Apolipoproteína
APO	Gene de apolipoproteína
bp	Pares de base; <i>base pair</i>
CETP	Proteína de transferência de éster de colesterol
Controle	Grupo DM2-DAC-
DAC	Doença Arterial Coronariana
DAC +	Presença de Doença Arterial Coronariana comprovada por coronarioangiografia
DAC –	Ausência de Doença Arterial Coronariana comprovada por coronarioangiografia
DM	Diabete melito
DM2 –	Ausência de Diabete melito tipo 2
DM2 +	Presença de Diabete melito tipo 2
DM2-DAC-	Grupo controle, composto de indivíduos sem diabetes tipo 2 e sem Doença Arterial Coronariana
DM2-DAC+	Grupo composto de indivíduos sem diabetes tipo 2 e com Doença Arterial Coronariana
DM2+DAC+	Grupo composto de indivíduos com diabetes tipo 2 e com Doença Arterial Coronariana
GL	Grau de liberdade
HbA_{1c}	Hemoglobina Glicada A _{1c}
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDL-C	HDL-Colesterol
IDL	Lipoproteína de densidade intermediária
IMC	Índice de massa corporal
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDL-C	LDL-Colesterol
Lp(a)	Lipoproteína (a)
LPL	Lipoproteína lipase
PCR	Reação em cadeia da polimerase; <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PPAR	Receptores de proliferação ativada do peroxissomo; <i>Peroxisome Proliferator Activated Receptors</i>
PPRE	Elemento de resposta específica

RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição; <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único; <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TG	Triglicérides
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
VLDL-C	VLDL-Colesterol

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -1131T>C DO GENE DA APO A-V NAS DIVERSAS POPULAÇÕES ESTUDADAS.....	14
TABELA 2	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO S19W DO GENE DA APO A-V NAS DIVERSAS POPULAÇÕES ESTUDADAS.....	15
TABELA 3	CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EM ESTUDO.....	19
TABELA 4	MARCADORES BIOQUÍMICOS.....	20
TABELA 5	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO POLIMORFISMO -1131T>C.....	22
TABELA 6	PROGRAMA UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO POLIMORFISMO -1131T>C.....	23
TABELA 7	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO POLIMORFISMO S19W.....	24
TABELA 8	PROGRAMA UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO POLIMORFISMO S19W.....	24
TABELA 9	CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO DO POLIMORFISMO -1131T>C.....	25
TABELA 10	CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO DO POLIMORFISMO S19W.....	25
TABELA 11	DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS POR SEXO E FATORES DE RISCO PARA DAC NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	30
TABELA 12	DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIAS DE IDADE.....	31
TABELA 13	VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS: DM2-DAC-, DM2-DAC+ E DM2+DAC+, COM MÉDIA (M) ± DESVIO PADRÃO (DP) E AMPLITUDE DE VARIAÇÃO (AV) DAS VARIÁVEIS ANALISADAS.....	32
TABELA 14	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W DO GENE DA APO A-V NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=66), DM2-DAC+ (N=75) E DM2+DAC+ (N=65) E NA AMOSTRA (N=206).....	37
TABELA 15	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DA AMOSTRA AMPLIADA PARA O POLIMORFISMO S19W DO GENE DA APO A-V NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=77), DM2-DAC+ (N=140) E DM2+DAC+ (N=78).....	38
TABELA 16	FREQÜÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W DO GENE DA APO A-V NOS GRUPOS DAC- (N=66) E DAC+ (N=140).....	39
TABELA 17	DISTRIBUIÇÃO DE FREQÜÊNCIA (%) DOS GENÓTIPOS -1131T>C/S19W DO GENE DA APO A-V NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=66), DM2-DAC+ (N=75) E DM2+DAC+ (N=65).....	40
TABELA 18	FREQÜÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DOS DIFERENTES HAPLÓTIPOS DO GENE DA APO A-V (-1131T>C/S19W) NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=66), DM2-DAC+ (N=75) E DM2+DAC+ (N=65).....	40

TABELA 19	DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (%) DOS GENÓTIPOS TT/WW E DE MAIS GENÓTIPOS -1131T>C/S19W DO GENE DA APO A-V NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=66), DM2-DAC+ (N=75) E DM2+DAC+ (N=65).....	41
TABELA 20	ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W E VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS COM PROBABILIDADE $\leq 0,10$	41
TABELA 21	FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO SS E SW EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DA MEDIANA DO ÁCIDO ÚRICO NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=77), DM2-DAC+ (N=140) E DM2+DAC+ (N=78).....	42
TABELA 22	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W EM RELAÇÃO ÀS CONCENTRAÇÕES DE TRIGLICÉRIDES NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=66), DM2-DAC+ (N=75) E DM2+DAC+ (N=65).....	42
TABELA 23	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO -1131T>C DO GENE DA APO A-V NAS DIVERSAS POPULAÇÕES ESTUDADAS E COMPARADAS COM O PRESENTE ESTUDO.....	49
TABELA 24	FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO S19W DO GENE DA APO A-V NAS DIVERSAS POPULAÇÕES ESTUDADAS E COMPARADAS COM O PRESENTE ESTUDO.....	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DOS GENES DAS APOLIPOPROTEÍNAS HUMANAS.....	9
FIGURA 2	ESTRUTURA GENÔMICA E LOCALIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>APOA5</i>	12
FIGURA 3	MODELO DE AÇÃO DA APOLIPOPROTEÍNA A-V.....	17
FIGURA 4	PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL.....	21
FIGURA 5	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO POLIMORFISMO -1131T>C DA APOLIPOPROTEÍNA A-V AMPLIFICADO E SUA LOCALIZAÇÃO.....	27
FIGURA 6	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO POLIMORFISMO S19W DA APOLIPOPROTEÍNA A-V AMPLIFICADO E SUA LOCALIZAÇÃO.....	28
FIGURA 7	PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO -1131T>C DO GENE DA APO A-V.....	33
FIGURA 8	PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO S19W DO GENE DA APO A-V.....	34
FIGURA 9	PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR-RFLP DO POLIMORFISMO -1131T>C DA APOLIPOPROTEÍNA A-V.....	35
FIGURA 10	PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA PCR-RFLP DO POLIMORFISMO S19W DA APOLIPOPROTEÍNA A-V.....	35

RESUMO

A apolipoproteína A-V (apo A-V) está associada com a regulação das concentrações plasmáticas de triglicérides (TG). Polimorfismos da apo A-V têm sido associados com a hipertrigliceridemia, um fator de risco independente para a Doença Arterial Coronariana (DAC), e também freqüente no Diabetes Melito tipo 2 (DM2). Foram analisados os polimorfismos -1131T>C e S19W em 206 indivíduos submetidos à cineangiocoronariografia. A amostra foi classificada em três grupos designados: controle, (DM2-DAC-, N=66); DM2-DAC+ (presença de DAC e ausência de DM2, N=75) e DM2+DAC+ (presença de DAC e DM2, N=65). A DAC foi definida como a presença de estenose > 50% em qualquer artéria coronária. O diagnóstico do DM2 foi realizado segundo os critérios da Associação Americana de Diabetes. A amostra apresentou idade média de $65,5 \pm 10,4$ anos, com prevalência de euro-brasileiros (92,8%). Foram analisadas as variáveis idade, sexo, tabagismo, pressão arterial, história familiar para DAC, IMC, bem como as concentrações séricas de glicose, HbA_{1c}, apo A-I, apo B, perfil lipídico e a relação log(TG/HDL-C). Apenas o IMC e o log(TG/HDL-C) foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os três grupos. Os polimorfismos em estudo foram caracterizados através de PCR-RFLP utilizando iniciadores que induzem a sítios de restrição para as enzimas *Mse* I (-1131T>C) e *Taq* I (S19W). A identificação dos fragmentos de restrição foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e os fragmentos de DNA visualizados com brometo de etídeo em luz UV. As freqüências para os genótipos -1131T>C (TT, TC e CC) e S19W (SS e SW) foram, respectivamente, para os grupos controle 0,848; 0,136; 0,015 e 0,818; 0,182; DM2-DAC+ 0,853; 0,120; 0,027 e 0,947; 0,053 e DM2+DAC+ 0,831; 0,138; 0,031 e 0,877; 0,123. A freqüência do genótipo SW foi significativamente menor no grupo DM2-DAC+ quando comparado aos grupos controle e DM2+DAC+. O polimorfismo -1131T>C não mostrou diferença entre os grupos. Para o polimorfismo -1131T>C a freqüência genotípica observada foi similar às populações inglesa, canadense e tunísica e para o genótipo TC + CC foi significativamente menor que o descrito para a população oriental. Para o polimorfismo S19W a freqüência genotípica observada foi similar às populações inglesa, tcheca e canadense e para o genótipo SW + WW foi significativamente maior que o descrito para as populações chinesa, norte-irlandesa e hispânica. O grupo DM2-DAC+ apresentou freqüências significativamente menores do haplótipo TW (-1131T>C/S19W) e do genótipo TT/SW em relação ao grupo controle. As concentrações séricas de ácido úrico foram significativamente correlacionadas com o polimorfismo S19W ($P = 0,010$), sendo que a freqüência do genótipo SW foi maior no grupo DM2+DAC+ com a concentração de urato $\geq 5,6$ mg/dL, tendo as mulheres como responsáveis pela alteração. Não houve diferença significativa entre as concentrações de TG e os polimorfismos em estudo.

Palavras-chave: Doença Arterial Coronariana, DAC, aterosclerose, Diabetes melito tipo 2, apolipoproteína A-V, apo A-V, APO A5, polimorfismo, SNP, RFLP, -1131T>C, SNP3, S19W.

ABSTRACT

Apolipoprotein A-V (apo A-V) is associated with plasmatic triglyceride (TG) level regulation. Apo A-V polymorphisms have been associated with hypertriglyceridaemia, an independent risk factor for Coronary Artery Disease (CAD), and also frequently in type 2 Diabetes Mellitus (DM2). The polymorphisms -1131T>C and S19W were analyzed in 206 individuals submitted to coronary angiography. The sample was classified into three groups called control (DM2-CAD-, N=66); DM2-CAD+ (presence of CAD and absence of DM2, N=75) and DM2+CAD+ (presence of CAD and DM2, N=65). CAD was defined as the presence of stenosis > 50% in any coronary artery. DM2 diagnosis was realized in agreement with American Diabetes Association criteria. The sample mean age was $65,5 \pm 10,4$ years, predominating Euro-Brazilians (92,8%). There were analyzed the variables age, sex, smoking, blood pressure, familial history for CAD, BMI, as well as serum levels of glucose, HbA_{1c}, apo A-I, apo B, lipid profile and the log(TG/HDL-C) ratio. Only the BMI and the log(TG/HDL-C) ratio were significantly different ($P < 0,05$) between the three groups. The polymorphisms in study were characterized after PCR-RFLP using primers that induce restriction sites to *Mse* I (-1131T>C) and *Taq* I (S19W) enzymes. Restriction fragments identification was realized by 10% acrylamide electrophoresis and the DNA fragments visualized with ethidium bromide in UV light. The frequencies to the genotypes -1131T>C (TT, TC and CC) and S19W (SS and SW) were, respectively, to control group 0,848; 0,136; 0,015 and 0,818; 0,182; DM2-CAD+ 0,853; 0,120; 0,027 and 0,947; 0,053 and DM2+CAD+ 0,831; 0,138; 0,031 and 0,877; 0,123. The SW genotype frequency was significantly lower in DM2-CAD+ group when compared with control and DM2+CAD+ groups. The -1131T>C polymorphism didn't show difference between the groups. The observed genotype frequency to the polymorphism -1131T>C was similar to the English, Canadian and Tunisian populations and to the genotype TC + CC it was significantly lower than the described to the oriental population. The observed genotype frequency to the polymorphism S19W was similar to the English, Czech and Canadian populations and to the genotype SW + WW it was significantly higher than the described to the Chinese, Northern Irish and Hispanic populations. Group DM2-CAD+ had significantly lower frequencies to haplotype TW (-1131T>C/S19W) and to genotype TT/SW compared to control group. The uric acid serum levels were significantly correlated with the polymorphism S19W ($P=0,010$), while the genotype SW frequency was higher in DM2+CAD+ group with the urate level $\geq 5,6$ mg/dL, being women as responsible for the alteration. There weren't significant differences between TG levels and the polymorphisms in study.

Key-words: Coronary Artery Disease, CAD, atherosclerosis, type 2 Diabetes mellitus, apolipoprotein A-V, apo A-V, APO A5, polymorphism, SNP, RFLP, -1131T>C, SNP3, S19W.

1 INTRODUÇÃO

A Doença Arterial Coronariana (DAC) é umas das causas de morte mais comuns no mundo. As concentrações séricas de colesterol total e de colesterol de baixa densidade (LDL-colesterol) estão significativamente associadas ao risco para DAC, entretanto, evidências apontam as concentrações de triglicérides como um fator de risco independente para o seu desenvolvimento (GINSBERG e TUCK, 2001). Devido à complexidade da hipertrigliceridemia, há várias origens possíveis para a desordem, incluindo causas secundárias como alcoolismo, diabetes melito e obesidade. No entanto, fatores genéticos predisponentes têm papel importante no metabolismo e regulação dos triglicérides e, assim, genes candidatos têm sido investigados.

Um gene fortemente candidato para a hipertrigliceridemia severa é o recentemente descoberto gene da apolipoproteína A-V humana (*APO A5*), baseado na sua modulação das concentrações séricas de triglicérides. Em camundongos, a superexpressão do gene *apoa5* promoveu diminuição das concentrações de triglicérides, enquanto que camundongos nocauteados tiveram aumento de quatro vezes nas concentrações de triglicérides (PENNACCHIO et al., 2001). Em humanos, estudos independentes demonstraram que haplótipos variantes em diferentes polimorfismos do *APO A5* são determinantes das concentrações séricas de triglicérides em várias populações (PENNACCHIO et al., 2002; TALMUD et al., 2002; OLIVIER et al., 2004).

O diabetes melito tipo 2 (DM2) está associado como um fator de alto risco para a Doença Arterial Coronariana. O fato de que muitos indivíduos com DAC possuem diabetes melito do tipo 2 torna importante a identificação de genes independentes que conferem susceptibilidade para DAC nestes pacientes.

Estudos epidemiológicos recentes demonstraram que a hipertrigliceridemia é um dos principais fatores de risco independentes para DAC (FRUCHART e DURIEZ, 2002). O entendimento dos fatores que controlam as concentrações plasmáticas de triglicérides e quais genes refletem primariamente nas concentrações de lipoproteínas circulantes ricas em triglicérides é de principal importância e pode fornecer novas frentes de intervenção terapêutica na dislipidemia aterogênica (TALMUD et al., 2002; PRIEUR et al., 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Associar os polimorfismos -1131T>C e S19W do gene da apolipoproteína A-V em uma população brasileira submetida à angiografia na presença de doença arterial coronariana e diabetes melito tipo 2.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito das variáveis antropométricas e bioquímicas em indivíduos com doença arterial coronariana na presença ou ausência de diabetes melito tipo 2 comparando com um grupo controle;
- Determinar as frequências alélicas, haplotípicas e genótípicas dos polimorfismos -1131T>C e S19W do gene da apolipoproteína A-V, através do procedimento de PCR-RFLP, correlacionando-as com a doença arterial coronariana, na presença ou ausência de diabetes melito tipo 2;
- Associar as frequências genótípicas com as concentrações de triglicérides;
- Verificar associação das frequências haplotípicas com doença arterial coronariana e diabetes melito tipo 2;
- Avaliar a capacidade discriminatória dos genótipos em estudo em relação à doença arterial coronariana e ao diabetes melito tipo 2.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA E DIABETE MELITO

As doenças cardiovasculares são a primeira causa de morte por doença no Brasil (Ministério da Saúde – Brasil, 2005) e em vários países do mundo (WHO – Organização Mundial da Saúde, 2004). Também são a principal causa de morbidade e mortalidade em indivíduos com diabetes melito tipo 2 (DM2) (TEMELKOVA-KURKTSCHIEV e HANEFELD, 2004).

Dentre as doenças cardiovasculares, a Doença Arterial Coronariana (DAC) destaca-se como a maior causadora de incapacidade e morte. É uma doença da idade adulta e de etiologia multifatorial (VOGEL e MOTULSKY, 1997). No Anexo I encontram-se os valores de referência para o perfil lipídico para adultos com idade superior a 20 anos.

A associação positiva entre triglicérides (TG) plasmáticos aumentados e DAC foi confirmada por meta-análise realizada por HOKANSON E AUSTIN (1996), indicando as concentrações de triglicérides plasmáticos como fator de risco independente para DAC e não meramente consequência do efeito das baixas concentrações de HDL-C.

O maior risco para DAC pelos níveis aumentados de TG plasmáticos resulta da superprodução de lipoproteínas ricas em TG e de lipoproteínas parcialmente hidrolisadas, que não podem ser removidas eficientemente da circulação e, assim, acumulam-se no plasma. Triglicérides dessas partículas são inapropriadamente transferidas para as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que se tornam depletadas de colesterol e ricas em triglicérides. Subseqüente hidrólise desses TG pela lipase hepática converte essas partículas de LDL em partículas menores e densas (LDL pequena e densa). Partículas de LDL pequenas e densas são propensas à oxidação porque não são mais clareadas pelo receptor de LDL (LDL-R), permanecendo na circulação. Estas partículas são então clareadas pelo receptor *scavenger* nos macrófagos, formando-se a célula espumosa e, conseqüentemente, a aterogênese (CHAPMAN et al., 1998).

A ocorrência de DAC varia amplamente no mundo e, geralmente, a maior frequência é encontrada em países ocidentais ou com estilo de vida ocidental. Estudos epidemiológicos prospectivos têm demonstrado que a incidência de DAC em indivíduos com diabetes melito (DM) é cerca de duas a três vezes maior do que a observada na população em geral (ROSEGREN et al., 1989; STAMLER et al., 1993). A prevalência de DM entre portadores de DAC aumentou significativamente nos últimos 10 anos (TAKAISHI et al., 2004). O aumento do risco de eventos cardiovasculares em indivíduos com DM2 pode ser relacionado, ao menos em parte, com anormalidades no metabolismo de lípidos e lipoproteínas (BERNARD et al., 2004).

A complexidade da DAC surge da diversidade de fenótipos clínicos e das múltiplas vias biológicas que contribuem para a formação da placa aterosclerótica, incluindo o metabolismo lipídico, inflamação, função endotelial, estresse oxidativo e trombose. Em adição aos fatores ambientais, variações interindividuais na susceptibilidade à DAC podem ocorrer da variabilidade nos genes que codificam proteínas que participam nessas e em outras vias biológicas (CHANNON e WATKINS, 2004). Os principais fatores de risco para DAC estão listados no Anexo II.

A aterosclerose coronariana resulta de respostas inflamatórias e fibroproliferativas exacerbadas a vários tipos de injúria ao endotélio e músculo liso da artéria, respostas nas quais participam um grande número de fatores de crescimento, citocinas e moléculas vasoreguladoras (SHIMOKATA et al., 2004). Pacientes com DM têm risco aumentado de desenvolver complicações específicas, dentre elas, a aterosclerose (American Diabetes Association, 2005), base fisiológica da Doença Arterial Coronariana.

O DM é uma síndrome de etiologia múltipla decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos. Caracteriza-se por hiperglicemia crônica com distúrbios do metabolismo dos carboidratos, lípidos e proteínas (American Diabetes Association, 2005). O diagnóstico de DM é realizado conforme o Anexo III.

O DM2 está presente em mais de 90-95% dos indivíduos com diabetes e anteriormente era descrito como diabetes não-insulino dependente ou diabetes da maturidade. A maioria dos pacientes com este tipo de diabetes apresenta

obesidade, a qual é relacionada à resistência à insulina. O risco de desenvolver DM2 aumenta com a idade, obesidade e falta de atividade física. O DM2 está associado com predisposição genética complexa (American Diabetes Association, 2005). A susceptibilidade para DAC em indivíduos com DM não pode ser inteiramente explicada por fatores de risco convencionais; existem fatores genéticos influenciando no desenvolvimento de complicações vasculares nestes indivíduos (LEVY, 2003).

O DM2 tem alta prevalência na população brasileira (7,6%) e é um importante fator de risco independente de DAC (Ministério da Saúde, 2005). Na mulher, é um fator de risco mais expressivo do que no homem, elevando a mortalidade por DAC em 3 a 7 vezes. No indivíduo com DM, é particularmente importante o controle associado dos outros fatores de risco – como sedentarismo, obesidade, tabagismo; para diminuição mais eficaz do risco de DAC (III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose, 2001).

O indivíduo portador de DM2 apresenta em geral um conjunto de anormalidades lipídicas caracterizado por concentrações aumentadas de TG, redução do HDL-C e alteração de LDL-C (KRAUSS, 2004), situação que tem sido referida como a Tríade Lipídica da Síndrome Metabólica.

A dislipidemia é um dos principais fatores de risco para doença cardiovascular em pacientes diabéticos. As alterações lipídicas mais frequentes na população diabética são hipertrigliceridemia, HDL-C baixo e alterações qualitativas nas lipoproteínas, tais como a formação de partículas de LDL pequenas e densas. A LDL pequena e densa é mais frequente na circulação quanto mais elevadas forem as concentrações de triglicérides, sendo mais aterogênica do que as demais partículas lipídicas que são maiores e menos densas (American Diabetes Association, 2005).

A doença arterial coronariana continua a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Vários estudos epidemiológicos estabeleceram que, em adição aos níveis plasmáticos elevados do LDL-C e reduzidos do HDL-C, as concentrações plasmáticas de TG contribuem como fator de risco independente para a DAC. Adicionalmente, a hipertrigliceridemia está frequentemente associada a síndromes metabólicas que caracterizam o DM e a obesidade. Assim, a identificação de fatores e/ou genes que afetam o metabolismo

dos TG é de significância clínica para a correção da hipertrigliceridemia e DAC associada (VU-DAC et al., 2003).

Vários estudos prospectivos demonstraram associação com hiperaciduremia e incidência de DAC, doença cardiovascular e morte. Também se sugeriu que as concentrações de ácido úrico estão mais fortemente associadas com eventos adversos em mulheres do que em homens (BRAND et al., 1985; FREEDMAN et al., 1995; LEHTO et al., 1998). O ácido úrico também está associado com DM e intolerância à glicose, fatores de risco que conferem maior risco relativo para doença cardiovascular em mulheres (WILSON et al., 1991; BARRET-CONNOR et al., 1991; SOWERS, 1998), assim como a síndrome metabólica, resistência à insulina, obesidade, hipertensão e dislipidemia (REAVEN, 1994; YOO et al., 2005).

3.2 LIPOPROTEÍNAS E APOLIPOPROTEÍNAS

Os lipídios são substâncias orgânicas pouco solúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Os principais lipídios no plasma humano são o colesterol livre ou esterificado, os ácidos graxos, os TG (também chamados de triacilgliceróis) e os fosfolípides (BURTIS et al., 1999).

Os ácidos graxos podem ser saturados, mono ou poliinsaturados. Nos animais, os resíduos de ácidos graxos predominantes são os que têm cadeia com 16 e com 18 átomos de carbono - o palmítico e o esteárico, que são saturados, e o oléico e o linoléico, que são insaturados. Os TG são a forma de armazenamento energético mais importante no organismo, constituindo depósitos no tecido adiposo e muscular. Os fosfolípidos têm, entre outras, a função primordial de formar a bicamada lipídica, que é a estrutura básica das membranas celulares. O colesterol é o precursor dos hormônios esteróides, dos ácidos biliares, da vitamina D, além de ter importantes funções nas membranas celulares, influenciando sua fluidez e no estado de ativação de enzimas ligadas a membranas (BURTIS et al., 1999).

As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte dos lipídios no plasma e são compostas por lipídios e proteínas, as chamadas apolipoproteínas ("apo"). As apolipoproteínas têm diversas funções no metabolismo das lipoproteínas como montagem da partícula (apo B-100 e B-48), meio ligante a receptores de membrana

que as captam para o interior da célula (apo B-100 e E) ou co-fatores enzimáticos (apo C-II, apo C-III e apo AI-) (BURTIS et al., 1999).

Existem quatro grandes classes de lipoproteínas. As maiores e menos densas, ricas em TG, os quilomícrons, de origem intestinal, e as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), de origem hepática. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade (HDL) são ricas em colesterol. Existe ainda uma quinta classe, as lipoproteínas de densidade intermediária (IDL}. Uma outra lipoproteína de interesse clínico é a lipoproteína (a) [Lp(a)] (BURTIS et al., 1999).

Os quilomícrons são sintetizados nas células da mucosa intestinal a partir das gorduras da dieta, posterior à absorção na forma de micelas, onde os TG são resintetizados, e, junto com o colesterol da dieta e fosfolípidos são acrescidos de apo B-48, proteína que é sintetizada nestas células. Uma vez no sangue, os quilomícrons adquirem apo E e apo C-II e têm seu tamanho progressivamente reduzido pela ação da lipoproteína lipase (LPL), que é ligada ao endotélio capilar e catalisa a remoção de ácidos graxos livres destas partículas. A LPL é ativada pela apo C-II no quilomícron, hidrolisando a maioria das partículas de triglicérides em ácidos graxos livres, que se ligam à albumina e são finalmente depositados no tecido adiposo. As partículas de quilomícrons remanescentes, depletadas de TG, são captadas pelo hepatócito através de um processo mediado por receptor, sendo a apo E do quilomícron o ligante para o receptor hepático de LDL. No hepatócito, o quilomícron remanescente libera seu conteúdo, isto é, TG, ésteres de colesterol, fosfolipídeos e apolipoproteínas. O hepatócito remonta esses produtos derivados do quilomícron remanescente, juntamente com TG endógeno e ésteres de colesterol, em partículas de VLDL, e as secreta para a circulação. Como os quilomícrons, as partículas de VLDL também são ricas em TG e contêm apo C-II e apo E. Entretanto, possuem menor quantidade de TG, são menores e apresentam a apo B-100 ao invés da apo B-48. A apo B-100 é um ligante fisiológico para o receptor de LDL. A LPL, novamente ativada pela apo C-II da partícula de VLDL, reduz o TG da VLDL, deixando a partícula progressivamente menor, mais densa e rica em colesterol até a formação de IDL. A hidrólise de TG da partícula de IDL em ácidos graxos livres é mediada por outra lipase, a lipase hepática, e a LDL é a partícula final desta via. Cerca de um terço da VLDL é removida pelo receptor hepático da LDL, enquanto

que dois terços passam pela via já descrita, terminando como LDL. A transição de VLDL para IDL é acompanhada pela transferência de apo C-II, para a HDL, e também pela sua remoção, da HDL, durante a transição da apo E da IDL para a LDL. Assim, a LDL, cuja meia-vida na circulação é de vários dias, contém apenas apo B-100 e somente uma cópia por partícula (BURTIS et al., 1999).

O transporte direto dos lípidos para as células periféricas é a via predominante para a entrega de ácidos graxos livres, o combustível metabólico primário do organismo. É a única via para a entrega do colesterol, que é essencial para a síntese e a manutenção das membranas celulares. O balanço metabólico do colesterol é mediado pelo seu transporte reverso pelas partículas de HDL. A lipoproteína HDL é sintetizada nas células da mucosa intestinal e nos hepatócitos e secretada como partícula de HDL nascente, contendo apenas uma pequena quantidade de fosfolípidos e apo A-I, denominada HDL-pré- β . Esta absorve avidamente o colesterol livre das células periféricas por via de difusão aquosa da membrana celular para a partícula. Esse efluxo de colesterol é facilitado pela ligação da partícula HDL nascente aos receptores de superfície celular, receptor *scavenger* B1 (SR-B1). Sendo o colesterol livre anfipático, ele é absorvido na superfície da HDL a partir de uma membrana celular doadora. A lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), ativada pela apo A-I catalisa a esterificação do colesterol, causando a entrada da molécula lipofílica de éster de colesterol no centro da partícula de HDL, liberando, assim, espaço na sua superfície para posterior absorção de colesterol. A ação coordenada de apo A-I, HDL e LCAT promove o acúmulo de ésteres de colesterol na partícula de HDL e contribui na manutenção unidirecional do transporte reverso do colesterol. Com a continuidade deste processo, a HDL gradualmente torna-se madura e adquire a sua forma esférica (α -HDL). Ao longo da absorção de colesterol, a HDL acumula apo C-II e apo E provenientes das partículas de VLDL e IDL. Uma das funções da HDL é servir de reservatório de apolipoproteínas, especialmente apo C-II, que é essencial para a ativação da LPL (BURTIS et al., 1999).

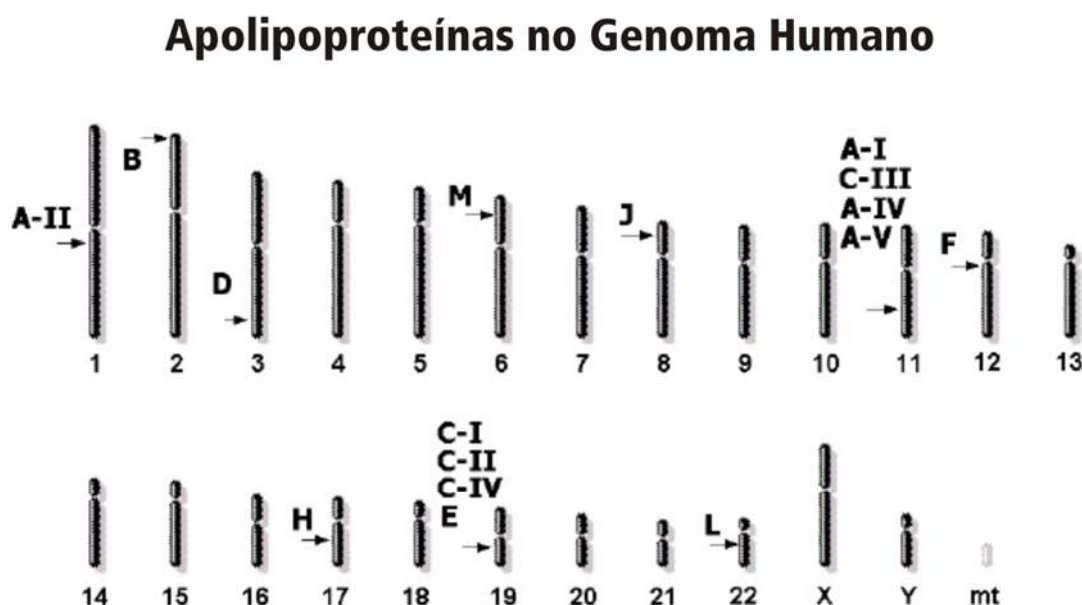
A remoção de lípidos da partícula madura de HDL ocorre por duas vias, direta e indireta. A via direta envolve dois caminhos, um é a remoção seletiva, mediada por SR-B1 (TRIGATTI et al., 2000) e o outro uma remoção através de “holopartícula”, mediada por receptores de apo E (FIDGE, 1999). A via indireta envolve a

transferência de ésteres de colesterol da HDL para lipoproteínas contendo apo B (VLDL, IDL e LDL) mediada pela proteína de transferência de éster de colesterol (CETP) (TALL et al., 2000). No fígado, os hepatócitos expressam receptores LDL na sua superfície celular que reconhecem a apo B e a apo E como ligantes fisiológicos. Assim, o receptor hepático de LDL media a retirada de remanescentes de quilomícrons, VLDL, IDL e LDL (BURTIS et al., 1999).

As apolipoproteínas estão envolvidas no metabolismo das lipoproteínas auxiliando na solubilidade dos lipídios no plasma, ativando as enzimas e permitindo a captação pelos tecidos. Defeitos na estrutura de uma apolipoproteína ou na sua síntese podem afetar o metabolismo dos lipídios resultando em progressão para a DAC (GROENENDIJK et al., 2001).

Embora existam vários fatores que contribuem para as concentrações plasmáticas de lipídios, as apolipoproteínas representam o principal componente na dinâmica do metabolismo lipídico. Até o presente momento foram identificadas as apolipoproteínas, classificadas de A a M (SEDA e SEDOVÁ, 2003). A Figura 1 mostra as duas principais regiões (*clusters*) de genes das apolipoproteínas nos cromossomos humanos 11 e 19.

FIGURA 1 – LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA DOS GENES DAS APOLIPOPROTEÍNAS HUMANAS



FONTE: SEDA e SEDOVÁ, 2003

O *cluster* dos genes das apolipoproteínas *APOA1/C3/A4* na região 23 do braço longo do cromossomo 11 (11q23) é uma região conhecida por influenciar os parâmetros lipídicos em humanos e mutações neste intervalo têm sido associadas como contribuintes na hipertrigliceridemia severa, evidenciada há mais de 15 anos (GROENENDIJK et al., 2001).

A apo A-I é uma proteína sintetizada principalmente no fígado e em menor extensão no intestino delgado (SORCI-THOMAS et al., 1989). É a principal proteína encontrada nas lipoproteínas de alta densidade (HDL) e é cofator obrigatório da enzima lecitina-colesterol acil transferase (LCAT) e, assim, participa na regulação do transporte reverso do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado. Camundongos desprovidos da expressão de apoA1 apresentaram níveis de HDL-C significativamente reduzidos (PLUMP et al., 1997).

A apolipoproteína C-II (apo C-II) é co-fator para a lipoproteína lipase (LPL), responsável pelo catabolismo das lipoproteínas ricas em triglicérides.

A apolipoproteína E, no seu papel de ligante, promove a captação de quilomícrons e lipoproteínas de densidade intermediária. Camundongos desprovidos da expressão do gene *APOE* desenvolveram hipercolesterolemia severa e aterosclerose espontânea (PLUMP et al., 1992).

A apolipoproteína C-III (apo C-III) é sintetizada principalmente no fígado e em menor proporção no intestino (BRUNS et al., 1984). A apo C-III é um componente intercambiável das lipoproteínas ricas em TG (TGRL) e das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Seu papel *in vivo* é pouco entendido. Estudos *in vitro* demonstraram que a apo C-III é um inibidor não competitivo da atividade da lipoproteína lipase, reduzindo a capacidade de hidrolisar as TGRL. Além disso, a apo C-III está envolvida no processo de ligação de lipoproteínas a receptores específicos no fígado (CLAVEY et al., 1995). Camundongos sem expressão da apo C3 apresentaram menor concentração de triglicérides plasmáticos quando comparados aos controles (MAEDA et al., 1994), enquanto que a superexpressão do gene *APOC3* humano resulta em hipertrigliceridemia. Isso se deve a um número aumentado na circulação de partículas de VLDL, que contêm maior quantidade de triglicérides e apo C-III e menor quantidade de apo E, reduzindo, assim, a retirada de lipoproteína mediada pela apo E (AALTO SETALA, 1992)

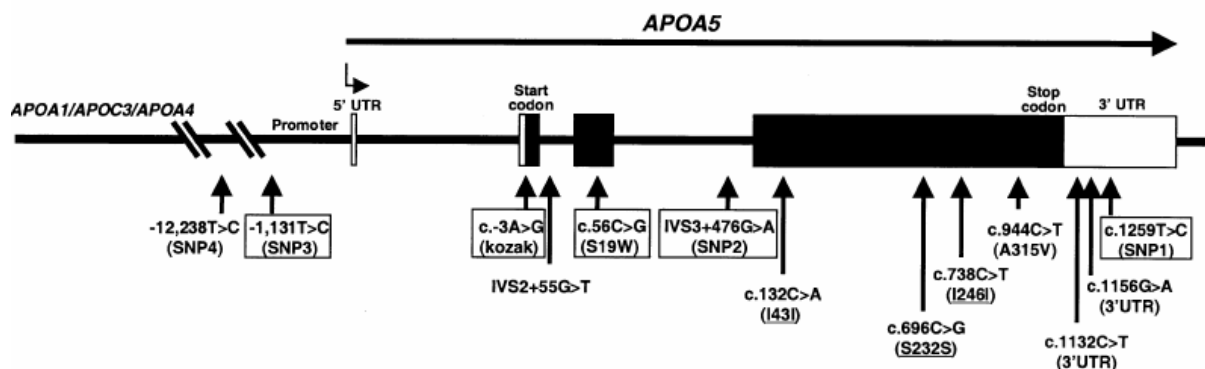
A apolipoproteína A-IV foi primeiramente descrita em 1977 por SWANEY et al. como um componente dos quilomícrons e das lipoproteínas de alta densidade (HDL) no rato. A proteína análoga apo A-IV humana é incorporada em novas TGRL secretadas no intestino e na HDL (BEISIEGEL e UTERMANN, 1979). A função metabólica da apo A-IV ainda não foi totalmente estabelecida. Sugeriu-se que a apo A-IV tem papel na absorção de lípidos. A síntese e secreção intestinal de apo A-IV é aumentada durante a absorção de gorduras (BISGAIER et al., 1985).

3.3 APOLIPOPROTEÍNA A-V

Uma importante descoberta na biologia dos TG foi feita em 2001 quando um novo membro da família da apolipoproteínas, a apolipoproteína A-V (apo A-V), foi identificada por técnicas pós-genômicas. Ela foi identificada independentemente por dois grupos distintos. O primeiro grupo utilizou comparação de seqüências ortólogas do homem e do camundongo (PENNACCHIO et al., 2001) e o segundo grupo identificou a apolipoproteína A5 do camundongo após observar a marcada super regulação do gene APOA5 durante regeneração hepática (VAN DER VLIET et al., 2001).

O gene da apolipoproteína A-V (Figura 2) foi identificado como o quarto membro do conjunto de genes (*cluster*) das apolipoproteínas APOA1/C3/A4 no cromossomo 11, estando localizado aproximadamente 27 kb distal do APOA4 e 37 kb do APOC3, sendo responsável pela síntese da apolipoproteína A-V (PENNACCHIO et al, 2001; OLIVIER et al., 2004).

FIGURA 2 - ESTRUTURA GENÔMICA E LOCALIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS DO GENE *APOA5*



O gene é transcrito da esquerda para a direita como indicado pela grande seta horizontal. Os exons são mostrados por caixas, sendo que as regiões codificadoras de proteínas estão pintadas de preto. As posições e identidades dos SNPs identificados no gene *APOA5* são mostrados abaixo do esquema. FONTE: Adaptado de PENNACCHIO et al., 2002.

A apo A-V humana é uma proteína de 39-kDa com 343 resíduos de aminoácidos e 27% de identidade à apo A-IV humana (WEINBERG et al., 2003). A apo A-V está presente no soro humano e circula em concentrações muito menores que outras lipoproteínas como a apo A-I. A concentração molar da apo A-V é de ~4 nmol/L, enquanto que apo A-I é encontrada no soro humano a ~40 µmol/L e a apo B a 2 µmol/L. Isso explica porque a apo A-V não foi descoberta no soro, como as demais apolipoproteínas codificadas no locus do cromossomo humano 11q23, e sim a nível molecular em estudos animais através de *open reading frames* (O'BRIEN et al., 2005; PENNACCHIO et al., 2001; VAN DER VLIET et al., 2001).

A apo A-V é detectada nas partículas de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), de alta densidade (HDL) e quilomícrons, mas não é encontrada nas lipoproteína de baixa densidade (LDL) (BECKSTEAD et al., 2003; WEINBERG et al., 2003; O'BRIEN et al., 2005).

O gene da apolipoproteína A-V é preferencialmente expresso no fígado. A exata função do gene *APOA5* ainda não está clara. Estudos demonstrando a superregulação do *APOA5* durante a regeneração hepática após hepatectomia parcial de ratos sugeriu um papel no controle da secreção de triglicérides (VAN DER VLIET et al., 2001). Estudos recentes sugeriram que o gene *APOA5* pode modular a

síntese hepática intracelular e/ou a secreção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) (BECKSTEAD et al., 2003; WEINBERG et al., 2003).

Os cinco haplótipos mais comuns do gene *APOA5* são definidos por sete polimorfismos de um único nucleotídeo [1891T>C (SNP1), 1764C>T, V153M, 751G>T (SNP2), S19W, -3A>G e -1131T>C (SNP3)] (OLIVIER et al., 2004). O haplótipo *APOA5**1 é o tipo selvagem, definido pelos alelos comuns nos sete sítios. O haplótipo *APOA5**2 é distinguido do haplótipo comum por quatro substituições de nucleotídeos (c.1259T>C ou 1891T>C, IVS3 + 476G>A ou 751G>T, -1131T>C e c.-3A>G designados SNP1, SNP2, SNP3 e Kozak, respectivamente, onde c. representa a região codificadora da proteína e o sinal negativo representa a região do promotor). O haplótipo *APOA5**3 é distinguido do haplótipo comum pela substituição de G por C no nucleotídeo c.56 (códon 19 na seqüência de aminoácidos), ocorrendo a substituição de uma serina por um triptofano, também conhecido como S19W (PENNACCHIO et al., 2001; PENNACCHIO et al., 2002).

Verificou-se que as concentrações plasmáticas de TG estão fortemente relacionadas com variações no gene da apolipoproteína A-V. Os camundongos em que o gene da apolipoproteína A-V humana foi superexpresso tinham os níveis plasmáticos de triglicérides cerca de um terço inferior em relação aos seus controles, enquanto que camundongos sem a expressão do gene (nocauteados por indução), apresentaram concentrações plasmáticas de triglicérides quatro vezes maiores do que os controles selvagens (PENNACCHIO et al., 2001).

As variantes -1131C e 19W têm sido associadas com concentrações aumentadas de TG em caucasianos saudáveis (PENNACCHIO et al., 2001; PENNACCHIO et al., 2002; TALMUD et al., 2002; PENNACCHIO et al., 2003) e em afro-americanos e hispânicos (PENNACCHIO et al., 2002) e com aumentado risco relativo no desenvolvimento de dislipidemias (RIBALTA et al., 2002; HORINEK et al., 2003).

A Tabela 1 resume as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo -1131T>C em diferentes estudos.

**TABELA 1 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO
-1131T>C DO GENE DA APO A-V NAS DIVERSAS POPULAÇÕES
ESTUDADAS**

População	Genótipos			Alelos		Descrição	Referência
	TT(N)	TC(N)	CC(N)	T(N)	C(N)		
Afro-americana	0,777 (537)	0,213 (147)	0,010 (7)	0,884 (1382)	0,116 (161)	Mulheres	PENNACCHIO et al., 2002
Afro-americana	0,772 (376)	0,218 (106)	0,010 (5)	0,881 (858)	0,119 (116)	Homens	
Hispânica	0,668 (125)	0,310 (58)	0,021 (4)	0,824 (308)	0,176 (66)	Mulheres	
Hispânica	0,741 (103)	0,245 (34)	0,014 (2)	0,863 (240)	0,137 (38)	Homens	
Caucasiana	0,866 (311)	0,134 (48)	0	0,933 (670)	0,067 (48)	Mulheres	
Caucasiana	0,872 (286)	0,128 (42)	0	0,936 (614)	0,064 (42)	Homens	
Inglesa	0,883 (2257)	0,111 (285)	0,006 (14)	0,940 (4799)	0,060 (313)	Homens	TALMUD et al., 2002
Japonesa	0,418 (425)	0,477 (485)	0,105 (107)	0,656 (1335)	0,344 (699)	Homens e Mulheres	NABIKA et al., 2002
Japonesa	0,408 (225)	0,476 (263)	0,116 (64)	0,646 (713)	0,354 (391)	Toda a amostra	ENDO et al., 2002
	0,241 (7)	0,483 (14)	0,276 (8)	0,483 (28)	0,517 (30)	TG alto	
	0,417 (218)	0,476 (249)	0,107 (56)	0,655 (685)	0,345 (361)	TG normal	
Chinesa	0,330 (27)	0,540 (44)	0,130 (11)	0,598 (98)	0,402 (66)	TG alto	BAUM et al., 2003
	0,520 (44)	0,430 (37)	0,050 (4)	0,735 (125)	0,265 (45)	TG normal	
Húngara	0,805 (174)	0,172 (53)	0,023 (7)	0,857 (401)	0,143 (67)	DAC+	SZALAI et al., 2004
	0,894 (277)	0,100 (31)	0,006 (2)	0,944 (585)	0,056 (35)	Controles	
Chinesa	0,404 (135)	0,494 (165)	0,102 (34)	0,651 (435)	0,349 (233)	Voluntários	LI et al, 2004
Canadense	0,848 (375)	0,138 (61)	0,014 (6)	0,917 (811)	0,083 (73)	Caucasianos	LEE et al., 2004
Inglesa	0,818 (242)	0,182 (54)				Homens	TALMUD et al., 2004
Tunísica	0,747 (74)	0,211 (21)	0,040 (4)	0,854 (169)	0,146 (29)	DM2-DAC-	CHAABA et al., 2005
	0,719 (41)	0,263 (15)	0,018 (1)	0,851 (97)	0,149 (17)	DM2-DAC+	
	0,718 (56)	0,269 (21)	0,013 (1)	0,853 (133)	0,147 (23)	DM2+DAC-	
	0,703 (52)	0,230 (17)	0,067 (5)	0,818 (121)	0,182 (27)	DM2+DAC+	
Chinesa	0,490 (246)	0,422 (212)	0,088 (44)	0,701 (704)	0,299 (300)	Controles	LIU et al., 2005
	0,375 (181)	0,468 (226)	0,157 (76)	0,609 (588)	0,391 (378)	DAC+	

N = número de indivíduos.

A Tabela 2 resume as frequências genótípicas e alélicas do polimorfismo S19W em diferentes estudos.

TABELA 2 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO S19W DO GENE DA APO A-V NAS DIVERSAS POPULAÇÕES ESTUDADAS

População	Genótipos			Alelos		Descrição	Referência
	SS(N)	SW(N)	WW(N)	T(N)	C(N)		
Afro-americana	0,861 (707)	0,132 (108)	0,007 (6)	0,927 (1522)	0,073 (120)	Mulheres	PENNACCHIO et al., 2002
Afro-americana	0,865 (494)	0,131 (75)	0,004 (2)	0,931 (1063)	0,069 (79)	Homens	
Hispanica	0,743 (185)	0,229 (57)	0,028 (7)	0,878 (427)	0,142 (71)	Mulheres	
Hispanica	0,696 (119)	0,292 (50)	0,012 (2)	0,842 (288)	0,158 (54)	Homens	
Caucasiana	0,874 (386)	0,122 (54)	0,004 (2)	0,934 (826)	0,066 (58)	Mulheres	
Caucasiana	0,892 (362)	0,108 (44)	0	0,946 (768)	0,054 (44)	Homens	
Inglesa	0,890 (2223)	0,105 (263)	0,004 (11)	0,943 (4709)	0,057 (285)	Homens	TALMUD et al., 2002
República Tcheca	0,699 (58)	0,265 (22)	0,036 (3)	0,831 (138)	0,169 (28)	TG alto	VRABLÍK et al., 2003
	0,859 (2198)	0,138 (352)	0,003 (9)	0,928 (4748)	0,072 (370)	Controles	
Canadense	0,875 (364)	0,115 (48)	0,010 (4)	0,933 (776)	0,067 (56)	Caucasianos	LEE et al., 2004
Inglesa	0,859 (268)	0,141 (44)		-	-	Homens	TALMUD et al., 2004
Chinesa	1,000 (502)	0	0	1,000 (1004)	0	Controles	LIU et al., 2005
	0,909 (439)	0,089 (43)	0,002 (1)	0,953 (921)	0,047 (45)	DAC+	
Norte Irlandesa	0,920 (480)	0,080 (41)	0	0,961 (1001)	0,039 (41)	Controles	WRIGHT et al., 2005
	0,710 (98)	0,250 (35)	0,040 (5)	0,837 (231)	0,163 (45)	TG alto	

N = número de indivíduos.

A proximidade do gene *APOA5* aos genes *APOA4/C3/A1* na mesma região gênica no cromossomo 11q23 levantou a questão se os efeitos de elevação nas concentrações de TG dos SNPs *APOA5* simplesmente refletiriam desequilíbrio de ligação com variantes funcionais no outro gene responsável pelo aumento dos TG, *APOC3*, ou se seriam efeitos funcionais independentes (TALMUD et al., 2002). Análise de haplótipos da região gênica *APOA5/A4/C3* identificou que, enquanto o polimorfismo S19W mostrou associação com as concentrações plasmáticas de TG,

independente do *APOC3*, o polimorfismo -1131T>C está em forte desequilíbrio de ligação com o polimorfismo *APOC3* -482C>T. Logo, associações do haplótipo *APOA5**2 podem ser devidas aos efeitos do -482C>T, que interrompe a resposta normal da insulina à apo C-III (TALMUD et al., 2002; OLIVIER et al., 2004; TALMUD et al., 2005).

A apolipoproteína A-V representa a primeira apolipoproteína descrita cuja superexpressão diminui os níveis de triglicérides. Sabendo-se que os fibratos são comumente utilizados na terapêutica para diminuição dos níveis de triglicérides em humanos, investigou-se a sua habilidade em modular a expressão do gene *APOA5* e conseqüentemente influenciar os níveis de triglicérides plasmáticos (VU-DAC et al., 2003).

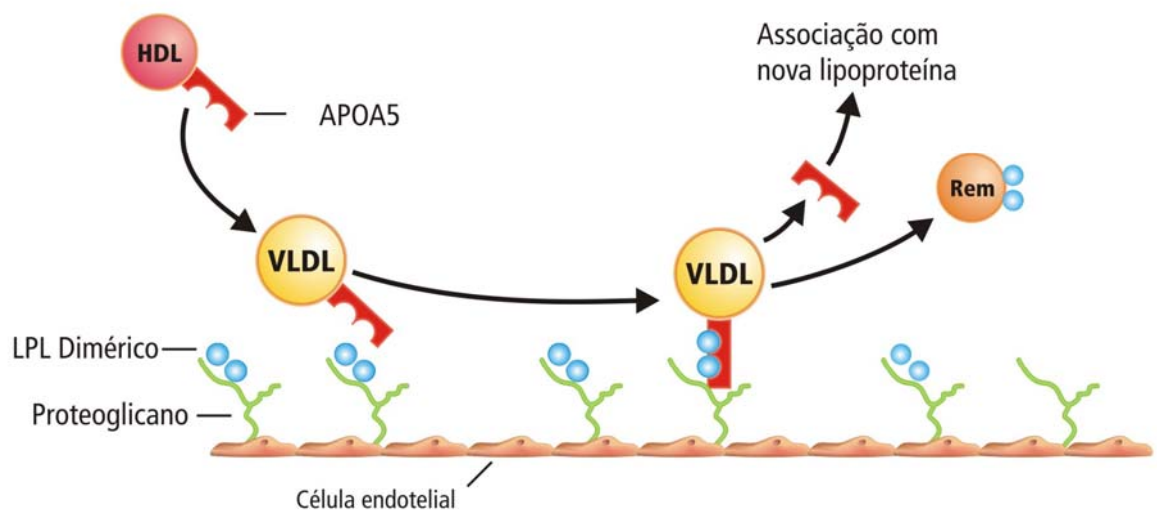
Fibratos são drogas hipolipemiantes com efeitos pleiotrópicos no metabolismo lipídico, incluindo a redução dos TG plasmáticos. A ação dos fibratos na diminuição dos TG é explicada pela diminuição da secreção hepática de lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) e no aumento da remoção dos TG plasmáticos. Estudos estabeleceram que esse efeito é mediado através da indução da expressão da lipoproteína lipase (SCHOONJANS et al., 1996) e pela repressão da expressão do gene *APOC3* pelos fibratos (STAELS et al., 1995). Demonstrou-se que uma via principal pela qual os fibratos regulam a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lipídeos ocorre através da ativação de receptores de proliferação ativada do peroxissomo α (PPAR α) (ISSEMAN e GREEN, 1990).

Receptores de proliferação ativada do peroxissomo (PPARs) são membros da superfamília de receptores nucleares hormonais de fatores transcripcionais ativados por ligantes que estão relacionados a receptores hormonais retinóides, esteróides e tireóides. Os PPARs desempenham um papel importante em muitas funções celulares, incluindo metabolismo lipídico, proliferação celular, diferenciação, adipogênese e sinalização inflamatória. Descobriu-se que os PPARs interagem com um número variado de lipídeos endógenos e drogas para o tratamento de doenças metabólicas (PPAR Signaling Pathway).

Estudos com hepatócitos primários humanos demonstraram que o *APOA5* é um gene alvo altamente responsivo ao PPAR α e suportam a sua função como principal mediador para redução dos TG plasmáticos pelos fibratos em humanos (PRIEUR et al., 2003; VU-DAC et al., 2003).

Desde a sua descoberta, dois mecanismos foram propostos para a ação da apo A-V humana. A apo A-V poderia inibir a produção hepática de VLDL (WEINBERG, et al., 2003; BECKSTEAD et al., 2003; OLOFSSON, 2005), ou seria um ativador intravascular da hidrólise dos TG pela LPL (FRUCHART-NAJIB et al., 2004; MERKEL et al., 2005; SCHAAP et al., 2004). O atual modelo de ação da apo A-V está representado na Figura 3.

FIGURA 3 – MODELO DE AÇÃO DA APOLIPOPROTEÍNA A-V



FONTE: MERKEL e HEEREN, 2005

Através da ligação aos quilomícrons ou à VLDL por um sítio e aos proteoglicanos endoteliais e à LPL pelo outro, a apo A-V estabiliza o sistema lipolítico endotelial e assim aumenta a hidrólise de TG mediada pela LPL. A apo A-V pode também estabilizar a LPL dimérica ou, menos provavelmente, modular a forma das lipoproteínas ricas em TG, tornando-as um melhor substrato para a LPL. A apo A-V pode ser reutilizada e transferida para outras partículas de lipoproteínas após a hidrólise, então baixas concentrações plasmáticas de apo A-V são suficientes para mediar esse efeito (MERKEL e HEEREN, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sangue de 206 pacientes, classificados nos grupos descritos abaixo, foram utilizadas para a realização desta pesquisa. O Projeto de Pesquisa “Variabilidade no Gene da Apolipoproteína A-V e Correlação com os Níveis Séricos de Triglicérides em Indivíduos com ou sem Diabetes Melito e Doença Arterial Coronariana” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (HC-UFPR) em 29 de março de 2005 pelo Protocolo CEP/HC 1004.043/2005-3.

A seleção dos pacientes e coleta de sangue foi realizada nos serviços de hemodinâmica do Hospital Cardiológico Costantini (N=179) e Hospital de Clínicas da UFPR (N=27). Para os pacientes submetidos a cateterismo ou angioplastia a coleta de sangue total foi realizada no início do procedimento, aproveitando o mesmo vaso utilizado para a angiografia, sendo coletado em tubos de vácuo (Vacutainer®, BD) utilizando EDTAK₃ (5 mL) para as extrações de DNA e gel separador (10 mL) para as análises bioquímicas.

A amostra foi dividida em três grupos de acordo com a presença ou não de Diabetes Melito tipo 2 (DM2), e também de acordo com a presença ou não de Doença Arterial Coronariana (DAC). Foi considerado DM2+ o paciente com a história clínica da doença e valor de glicose em jejum ≥ 126 mg/dL e considerado DAC+ o paciente com estenose $> 50\%$ em pelo menos uma das artérias (Diretrizes de Doença Coronariana Crônica Angina Estável), através de cineangiocoronariografia. Os grupos foram caracterizados de acordo com os seguintes perfis:

- Grupo 1: pacientes não portadores de doença arterial coronariana comprovada através de angiografia coronária (“cateterismo branco”) e não portadores de diabetes melito (DM2-DAC-), considerado grupo controle;
- Grupo 2: pacientes não portadores de diabetes melito e portadores de doença arterial coronariana comprovada através de angiografia coronária (DM2-DAC+);
- Grupo 3: pacientes portadores de diabetes melito e portadores de doença arterial coronariana comprovada através de angiografia coronária (DM2+DAC+).

A Tabela 3 sumariza a classificação dos grupos estudados.

TABELA 3 - CARACTERIZAÇÃO DOS GRUPOS EM ESTUDO

Grupo	Número de Indivíduos	Características
DM2-DAC-	N = 66 (30 homens; 36 mulheres)	Sem diabetes melito tipo 2 e sem Doença Arterial Coronariana
DM2-DAC+	N = 75 (53 homens; 22 mulheres)	Sem diabetes melito tipo 2 e com Doença Arterial Coronariana
DM2+DAC+	N = 65 (38 homens; 27 mulheres)	Com diabetes melito tipo 2 e com Doença Arterial Coronariana

O grupo DM2-DAC- foi composto de 62 euro-brasileiros e 4 afro-brasileiros. O grupo DM2-DAC+ foi composto de 71 euro-brasileiros, 2 afro-brasileiros e 2 orientais. O grupo DM2+DAC+ foi composto de 58 euro-brasileiros, 5 afro-brasileiros e 2 orientais. Foram excluídos deste estudo pacientes com patologias não relacionadas ao diabetes melito ou à doença cardiovascular, como hepatopatias e doenças pulmonares.

4.1 DADOS DOS PACIENTES

4.1.1 Variáveis antropométricas

As variáveis antropométricas dos pacientes foram obtidas de acordo com ficha de coleta de dados padronizada, cujo modelo encontra-se no Anexo IV.

4.1.2 Variáveis bioquímicas

As variáveis bioquímicas foram quantificadas no soro, obtido por coleta a vácuo em tubo de 10 mL com gel separador (Vacutainer®, BD). Os princípios metodológicos e reagentes empregados estão sumarizados na Tabela 4. Os ensaios, calibração e controle de qualidade foram realizados conforme protocolo fornecido pelo fabricante do reagente. Os reagentes utilizados são específicos de cada sistema automatizado. Todas as análises foram realizadas no Laboratório Frischmann Aisengart de Curitiba-PR.

TABELA 4 - MARCADORES BIOQUÍMICOS

DOSAGEM	METODOLOGIA	AUTOMAÇÃO/MARCA
Apolipoproteína A	Imunoturbidimétrico	Hitachi 912 / Roche
Apolipoproteína B	Imunoturbidimétrico	Hitachi 912 / Roche
Colesterol total	Enzimático, colorimétrico	Vitros 750 / Johnson & Johnson
Glicose	Enzimático, glicose oxidase	Vitros 750 / Johnson & Johnson
Ácido úrico	Enzimático, colorimétrico	Vitros 750 / Johnson & Johnson
HDL-Colesterol	Homogêneo, enzimático	Hitachi 912 / Roche
Hemoglobina glicada	HPLC com troca iônica	Variant / BioRad
LDL-Colesterol	Homogêneo, enzimático	Hitachi 912/ Roche
Triglicérides	Enzimático, colorimétrico	Vitros 750 / Johnson & Johnson

Os valores de referência para os parâmetros bioquímicos encontram-se no Anexo V.

4.2 REAGENTES

A enzima Taq DNA polimerase foi adquirida da MGM Assessoria Biológica S.A., bem como o tampão para Taq DNA polimerase e solução de cloreto de magnésio 50 mM. Os desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP) foram adquiridos da Amersham Biosciences. Os marcadores de massa molecular de 100 pares de base (100 bp) e de 123 pares de base (123 bp) foram adquiridos da Amersham Biosciences e Invitrogen, respectivamente. Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela Alpha DNA. A agarose e a acrilamida foram adquiridas da Invitrogen. A água reagente tipo I, apresentando condutividade de 18,2 mΩ-cm, foi obtida em sistema Milli-Q (Millipore) e esterilizada por autoclavação. Os demais reagentes foram provenientes de diversas fontes, sendo todos reagentes de grau analítico.

4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

O DNA genômico foi purificado de sangue total, coletado com sistema a vácuo na presença de EDTA (Vacutainer®, BD), utilizando o procedimento descrito por LAHIRI e NURNBERGER (1991), adaptado para tubos do tipo Eppendorf de 1,5 mL, como descrito abaixo. A Figura 4 esquematiza as etapas da extração do DNA.

FIGURA 4 - PROCESSO DE EXTRAÇÃO DO DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL



O sangue total (1 mL) foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. O plasma foi removido com auxílio de pipeta automática. Para ocorrer a hemólise, ao sedimento foi adicionado 900 μ L de TKM1 contendo o detergente Nonidet P-40 (Sigma) a 2,5%, homogeneizando por inversão. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 3 minutos, desprezando o sobrenadante. Ao sedimento foi adicionado 1 mL de TKM1 (sem Triton) e homogeneizado em agitar por alguns segundos, sendo esse processo repetido até que o sedimento se tornasse esbranquiçado. O sobrenadante foi novamente descartado. As proteínas foram precipitadas em meio contendo alta concentração de cloreto de sódio (concentração final de 3 mol/L) e na presença de 10% de SDS (dodecil sulfato de sódio). O DNA presente no sobrenadante foi, então, precipitado em 2 volumes de etanol absoluto e as impurezas removidas com duas lavagens com etanol a 70%. O DNA seco a temperatura ambiente foi solubilizado em água do tipo Milli-Q estéril e ajustado para uma concentração de aproximadamente 100 ng/ μ L e as amostras foram mantidas em freezer a -20°C . O tempo aproximado para extração de uma amostra foi de 60 minutos.

A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria em 260 nm e a pureza pela relação da Absorbância 260/Absorbância 280 ($A_{260/280}$). O procedimento possibilitou a obtenção de amostras com DNA nas concentrações de 50 a 500 ng/ μ L e relação $A_{260/280}$ entre 1,5 e 1,9.

4.4 AMPLIFICAÇÃO DO DNA E IDENTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA

A reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizada para amplificar o DNA dos pacientes em estudo foi realizada em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) utilizando os protocolos descritos abaixo para cada polimorfismo em estudo. A sequência do gene da apo A-V com a identificação dos produtos da PCR para os polimorfismos -1131T>C e S19W são mostrados no Anexo VI.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados na metodologia da PCR foram estão descritos abaixo.

4.4.1 Polimorfismo -1131T>C

F 5' GGAGCTTGTGAACGTGTGTATGAGT 3';

R 5' CCCCAGGAAGTGGAGCGAAATT 3'.

Essa amplificação foi desenhada para forçar uma substituição C>A (T no iniciador reverso), que introduz um sítio de restrição para *Mse* I (T↓TAA) no alelo comum. Esses iniciadores fornecem um produto de PCR de 154 bp, e após a restrição enzimática, fragmentos de 133 bp e 21 bp para o alelo T e um único produto não cortado para o alelo C.

TABELA 5 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO POLIMORFISMO -1131T>C

REAGENTES E DNA	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME
DNA molde	~ 10 ng/μL	1,0 μL
Tampão Taq (10X)	1 X	1,0 μL
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mmol/L	0,3 μL
dNTP (5mM)	0,2 mmol/L	0,4 μL
Oligonucleotídeos Iniciadores (10 pmol/μL cada)	10 pmol (cada)	1,0 μL
Taq DNA polimerase (5U/ μL)	2 U	0,4 μL
Água Reagente tipo 1 estéril	----	5,9 μL
	Volume final	10 μL

Tampão Taq 10X concentrado: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl

TABELA 6 – PROGRAMA UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO POLIMORFISMO -1131T>C

Nº CICLOS	ETAPAS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1X	Desnaturação	96	5 min
31 X	Desnaturação	96	30 s
	Anelamento	58	30 s
	Extensão	72	45 s
1 X	Extensão Final	72	10 min

A quantidade e qualidade do produto de PCR obtido foram determinadas através da eletroforese submarina em gel de agarose a 1,5% (cuba Horizon 58®, Life Technologies) a 60 V e 30 mA durante 1 hora em tampão TBE 1X (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). O DNA foi corado com solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens dos géis foram obtidas com câmara CCD em sistema Biochemi (UVP).

4.4.2 Polimorfismo S19W

F 5' GGCTCTTCTTTCAGGTGGGTCTCCG 3';

R 5' GCCTTTCCGTGCCTGGGTGGT 3'.

Os iniciadores foram desenhados para forçar uma substituição G>A (T no iniciador reverso), introduzindo um sítio de restrição para a enzima *Taq* I (T↓CGA) no alelo raro. Esses iniciadores fornecem um produto de PCR de 157 bp, e após a restrição enzimática, fragmentos de 134 bp e 23 bp para o alelo T e um único produto não cortado para o alelo C.

**TABELA 7 – CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DO
POLIMORFISMO S19W**

REAGENTES E DNA	CONCENTRAÇÃO FINAL	VOLUME
DNA molde	~ 10 ng/μL	1,0 μL
Tampão Taq (10X)	1 X	1,0 μL
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 mmol/L	0,3 μL
dNTP (5mM)	0,2 mmol/L	0,4 μL
Oligonucleotídeos Iniciadores (10 pmol/μL, cada)	10 pmol (cada)	1,0 μL
Taq DNA polimerase (5U/ μL)	2 U	0,4 μL
Água Reagente tipo 1 estéril	----	5,9 μL
	Volume final	10 μL

Tampão *Taq* 10X concentrado: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl

**TABELA 8 – PROGRAMA UTILIZADO PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS
DO POLIMORFISMO S19W**

Nº CICLOS	ETAPAS	TEMPERATURA (°C)	TEMPO
1X	Desnaturação	94	3 min
	Desnaturação	94	15 s
30 X	Anelamento	70	20 s
	Extensão	72	30 s
1 X	Extensão Final	72	1 min

A quantidade e qualidade do produto de PCR obtido foram determinadas através da eletroforese submarina em gel de agarose a 1,5% (cuba Horizon 58, Life Technologies) a 60 V e 30 mA durante 1 hora em tampão TBE 1X (Tris-hidroximetilaminometano 89 mmol/L; ácido bórico 89 mmol/L e EDTA 1 mmol/L, pH 8,2). O DNA foi corado com solução de brometo de etídeo 0,5 μg/mL e visualizado em transiluminador sob luz ultravioleta (302 nm). As imagens dos géis foram obtidas com câmara CCD em sistema Biochemi (UVP).

4.5 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO -1131T/C DO GENE DA APO A-V HUMANA

Para determinação do polimorfismo -1131T>C, os produtos de amplificação foram submetidos a digestão pela enzima *Mse* I (New England Biolabs) conforme descrito na Tabela 9.

TABELA 9 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO DO POLIMORFISMO -1131T>C

REAGENTES	REAÇÃO	CONCENTRAÇÃO FINAL
Enzima <i>Mse</i> I (10 U/ μ L)	0,25 μ L	0,125 U
NE Buffer 2 (10X)	2,0 μ L	1X
Albumina Bovina (100 μ g/mL)	0,2 μ L	0,001 μ g
Produto de PCR apo A-V	2,0 μ L	20 a 50 ng
Água Reagente tipo 1 estéril	15,55 μ L	----
Volume final	20 μ L	----
Homogeneizar e deixar em Banho-maria a 37°C por 16 horas		
NE Buffer 2 [10X]: 50 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 10 mM MgCl ₂ ; 1mM DTT ; pH 7,9 25°C		

4.6 REAÇÃO DE RESTRIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO S19W DO GENE DA APO A-V HUMANA

Para determinação do polimorfismo S19W, os produtos de amplificação foram submetidos a digestão pela enzima *Taq* I (Q-BIOgene) conforme descrito na Tabela 10.

TABELA 10 – CONDIÇÕES DA REAÇÃO DE RESTRIÇÃO DO FRAGMENTO DO POLIMORFISMO S19W

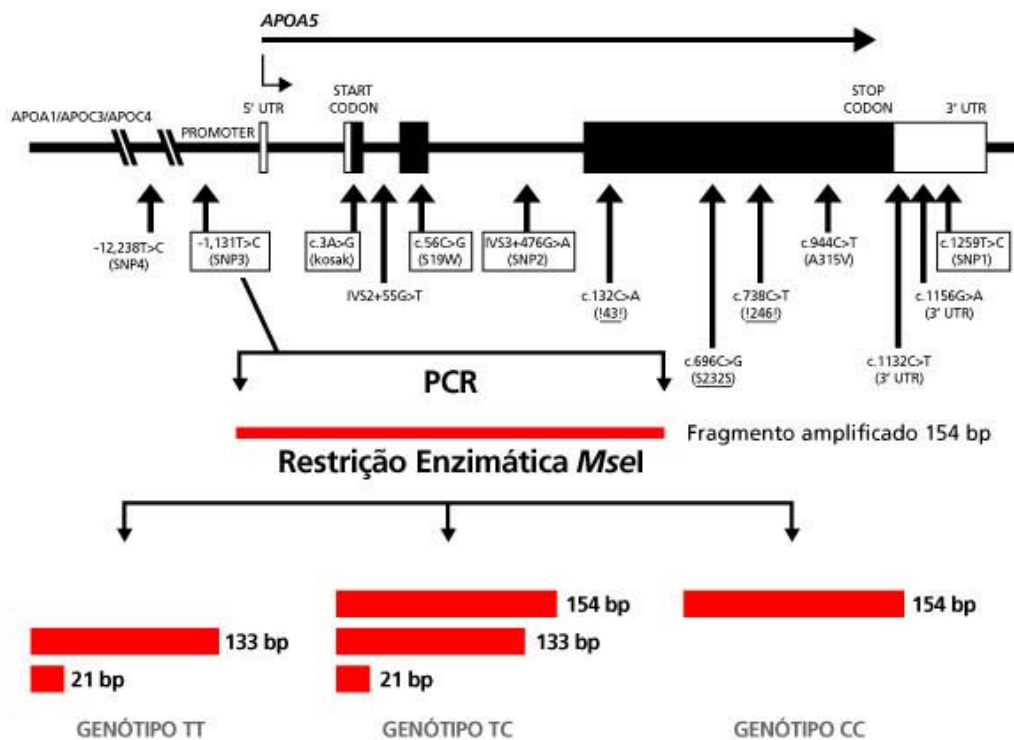
REAGENTES	REAÇÃO	CONCENTRAÇÃO FINAL
Enzima <i>Taq</i> I (10 U/ μ L)	0,17 μ L	0,34 U
Buffer <i>Taq</i> I (10X)	0,5 μ L	1 X
Albumina Bovina (1 μ g/ μ L)	0,5 μ L	0,1 μ g
Produto de PCR apo A-V	1,5 μ L	15 a 30 ng
Água Reagente tipo 1 estéril	2,33 μ L	----
Volume final	5 μ L	----
Homogeneizar e deixar em Banho-Maria a 65°C por 3 horas		
Buffer <i>Taq</i> I (10X): 100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl (pH 8,4, 25°C); 10mM MgCl ₂ ; 1 mM dithiothreitol		

4.7 IDENTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO

Ao produto de restrição (5 ou 10 µL) foi adicionado 3 µL de solução de glicerol 30% contendo os corantes azul de bromofenol (0,05%) e xileno cianol (0,05%). A mistura foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 10% (cuba Rubi, Amersham Biosciences) com 150 V e 51 mA. Para o preparo da poliacrilamida dissolveu-se a acrilamida (29 g) e a bisacrilamida (1 g) em copo de Becker e com auxílio de agitador magnético. Adicionou-se à mistura aproximadamente 2,5% de resina Dowex MB3 (Sigma) e deixou-se no agitador magnético por no mínimo 2 horas em baixa velocidade para deionizar a acrilamida. Filtrou-se a mistura em papel de filtro e completou-se o volume (100 mL) com água reagente. Para o preparo de 1 gel de poliacrilamida 10% (45 mL) adicionou-se 15 mL da acrilamida 29:1, 4,5 mL de TBE 10X, 25,5 mL de água mili-Q, 300 µL de persulfato de amônio 10% e 50 µL de TEMED. A eletroforese foi interrompida quando o corante azul de bromofenol atingia aproximadamente 2/3 do gel. Os fragmentos de DNA foram corados com brometo de etídeo 0,5 µg/mL e visualizados em transiluminador UV (302 nm). Os eletroforetogramas foram registrados com o sistema de captação de imagens digital com câmera CCD, Biochemi (UVP).

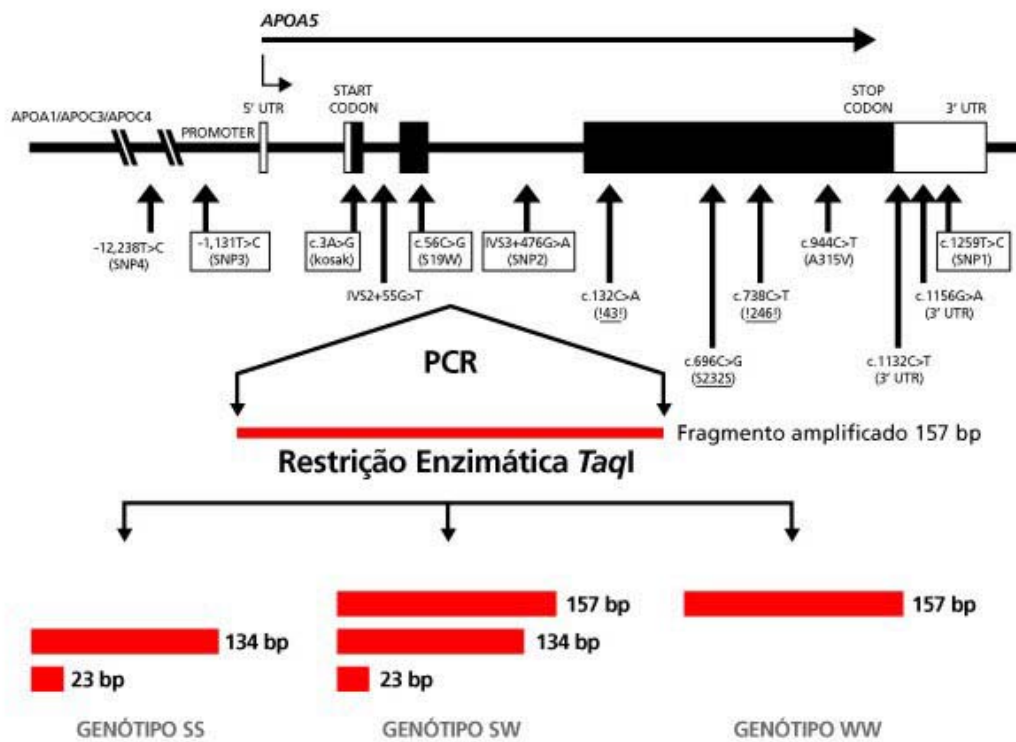
Os sítios de clivagem das enzimas *Mse* I e *Taq* I para os polimorfismo -1131T>C e S19W, respectivamente, bem como os possíveis genótipos e os tamanhos dos fragmentos produzidos estão mostrados nas Figuras 5 e 6.

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO POLIMORFISMO -1131T>C DA APOLIPOPROTEÍNA A-V AMPLIFICADO E SUA LOCALIZAÇÃO



FONTE: Adaptado de OLIVIER et al., 2004.

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO POLIMORFISMO S19W DA APOLIPOPROTEÍNA A-V AMPLIFICADO E SUA LOCALIZAÇÃO



FONTE: Adaptado de OLIVIER et al., 2004.

5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistica para Windows versão 5.0.

Os níveis médios dos marcadores bioquímicos foram comparados entre os diferentes grupos estudados utilizando a análise da variância (ANOVA) ou teste “t” para amostras não pareadas. As determinações de TG que não apresentaram distribuição normal, foram logaritmicamente transformadas para normalização. As frequências alélicas foram obtidas pela contagem dos genes.

Para a análise das variáveis categóricas foram utilizados o teste exato de Fisher (bidirecional) ou o teste do Chi-quadrado, conforme as características da análise.

As tabelas de contingência foram analisadas utilizando o programa estatístico RxC (MILLER, 2005).

As frequências haplotípicas foram obtidas empregando-se o método da verossimilhança máxima, programa ARLEQUIM – versão 3 (EXCOFFIER e SCHNEIDER, 2005).

Valores de $P < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra estudada foi composta por 206 indivíduos, sendo 191 euro-brasileiros (92,8%), 11 afro-brasileiros (5,3%) e 4 orientais (1,9%). As distribuições dos indivíduos por sexo e fatores de risco para DAC estão descritos na Tabela 11.

TABELA 11 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS POR SEXO E FATORES DE RISCO PARA DAC NOS GRUPOS ESTUDADOS

N = 206	SEXO				FATORES DE RISCO PARA DAC											
	Masculino		Feminino		Tabagismo				Hipertensão Arterial				Histórico Familiar de DAC			
					Sim		Não		Sim		Não		Sim		Não	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
DM2-DAC-	30	45,5	36	54,5	26	39,4	40	60,6	24	36,4	42	63,6	27	40,9	39	59,1
DM2-DAC+	53	70,7	22	29,3	48	64	27	36	34	45,3	41	54,7	31	41,3	44	58,7
DM2+DAC+	38	58,5	27	41,5	32	49,2	33	50,8	35	53,9	30	46,1	29	44,6	36	55,4
* χ^2 (P)	* $\chi^2=9,21$; P= 0,010				* $\chi^2=8,69$; P= 0,012				* $\chi^2=2,33$; P=0,314				* $\chi^2=0,22$; P=0,890			
DM2-DAC- X DM2-DAC+	$\chi^2=9,22$; P= 0,024				$\chi^2=8,52$; P= 0,003				$\chi^2=1,17$; P=0,280				$\chi^2=0,00$; P=0,959			
DM2-DAC- X DM2+DAC+	$\chi^2=2,22$; P=0,136				$\chi^2=1,28$; P=0,257				$\chi^2=4,04$; P= 0,044				$\chi^2=0,18$; P=0,668			
DM2-DAC+ X DM2+DAC+	$\chi^2=2,28$; P=0,131				$\chi^2=3,10$; P=0,078				$\chi^2=1,01$; P=0,315				$\chi^2=0,15$; P=0,695			

N = Número de indivíduos

Teste de Chi-quadrado com Grau de Liberdade = 1.

*Teste de Chi-quadrado com Grau de Liberdade = 2.

A Tabela 12 ilustra a distribuição de frequências da idade entre os grupos estudados.

TABELA 12 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIAS DA IDADE

Faixa etária (anos)	Frequências (N)							
	Todos		DM2-DAC-		DM2-DAC+		DM2+DAC+	
	N	%	N	%	N	%	N	%
< 36 – 40	2	0,97	1	1,51	1	1,33	0	0
41 – 45	9	4,37	4	6,06	4	5,33	1	1,54
46 – 50	11	5,34	6	9,09	3	4,00	2	3,08
51 – 55	24	11,65	9	13,64	10	13,33	5	7,69
56 – 60	36	17,48	15	22,72	11	14,66	10	15,38
61 – 65	36	17,48	9	13,66	12	16,00	15	23,08
66 – 70	28	13,59	11	16,66	6	8,00	11	16,92
71 – 75	34	16,50	9	13,64	13	17,33	12	18,46
76 – 80	16	7,77	1	1,51	8	10,67	7	10,77
> 81	10	4,85	1	1,51	7	9,33	2	3,08
Total	206	100	66	100	75	100	65	100
Média	65,5		59,0		63,6		64,8	
Desvio Padrão	10,4		9,9		11,5		8,6	
Mediana	62,0		58,0		62,0		64,0	
Amplitude de Variação	36 - 84		36 - 83		36 - 84		43 - 83	

N = Número de indivíduos

Foi realizado o teste “t” para comparação entre as médias de idade. Os resultados foram: grupo controle vs grupo DM2-DAC+ (“t” = -2,51; **P = 0,013**); grupo controle vs grupo DM2+DAC+ (“t” = -3,53; **P < 0,001**) e grupo DM2-DAC+ vs DM2+DAC+ (“t” = -0,654; P = 0,514).

As Médias (M) ± Desvio Padrão (DP), a Amplitude de Variação (AV) e valores de P dos dados antropométricos e bioquímicos dos 3 grupos estudados estão demonstrados na Tabela 13.

TABELA 13 – VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS DOS GRUPOS: DM2–DAC–, DM2–DAC+ E DM2+DAC+, COM MÉDIA (M) ± DESVIO PADRÃO (DP) E AMPLITUDE DE VARIAÇÃO (AV) DAS VARIÁVEIS ANALISADAS

Variáveis	Grupo DM2–DAC– (N=66)		Grupo DM2–DAC+ (N=75)			Grupo DM2+DAC+ (N=65)			P ^{***}
	M ± DP	AV	M ± DP	AV	P [*]	M ± DP	AV	P ^{**}	
IMC (kg/m²)	23,9 ± 3,3	16,5 – 33,8	26,1 ± 3,9	17,9 – 41,8	0,006	27,7 ± 4,9	18,9 – 45,8	<0,001	0,046
Pressão arterial sistólica (mmHg)	140,7 ± 20,6	95 – 220	144,3 ± 20,3	110 – 200	0,558	145,2 ± 20,9	100 – 200	0,432	0,966
Pressão arterial diastólica (mmHg)	79,9 ± 9,4	60 – 100	77,9 ± 8,9	60 – 100	0,361	79,9 ± 8,6	59 - 100	0,998	0,398
Hemoglobina glicada (%)	5,3 ± 0,6	2,6 – 6,4	5,4 ± 0,5	3,0 – 6,5	0,868	7,7 ± 1,6	5,1 – 12,4	<0,001	<0,001
Glicose (mg/dL)	91,0 ± 11,1	71 – 116	92,9 ± 11,9	67 – 123	0,956	157,4 ± 67,8	80 – 340	<0,001	<0,001
Colesterol Total (mg/dL)	175,1 ± 35,0	114 – 290	167,9 ± 38,3	74 – 295	0,503	170,8 ± 40,2	94 – 303	0,797	0,893
HDL-C (mg/dL)	47,8 ± 12,5	24 – 78	43,1 ± 10,3	24 – 69	0,028	40,6 ± 9,8	21 – 66	<0,001	0,365
LDL-C (mg/dL)	119,3 ± 29,7	52 – 192	111,0 ± 35,8	29 – 257	0,264	111,7 ± 28,3	46 – 174	0,350	0,991
Triglicérides (mg/dL)	105,8 ± 58,1	31 – 418	130,6 ± 61,8	31 – 362	0,130	164,4 ± 102,7	57 – 588	<0,001	0,023
log Triglicérides	1,97 ± 0,22	1,49 – 2,62	2,07 ± 0,20	1,49 – 2,56	0,015	2,15 ± 0,22	1,75 – 2,77	<0,001	0,054
Apolipoproteína A-I (mg/dL)	120,3 ± 26,9	74 – 178	111,1 ± 24,5	58 – 184	0,083	114,4 ± 25,2	61 – 176	0,386	0,722
Apolipoproteína B (mg/dL)	89,3 ± 23,9	40 – 163	89,0 ± 27,8	19 – 184	0,997	93,1 ± 24,7	45 - 149	0,681	0,620
Ácido úrico (mg/dL)	5,5 ± 1,6	2,4 – 9,7	5,9 ± 1,6	3,3 - 11	0,299	6,0 ± 1,9	2,7 12,6	0,224	0,972
log (TG/HDL-C)	0,32 ± 0,29	0,38 – 1,10	0,45 ± 0,24	0,06 – 1,05	0,012	0,56 ± 0,26	0,06 – 1,22	<0,001	0,037

N= número de indivíduos

P^{*} = diferença estatística entre Grupo Controle (DM2–DAC–) e Grupo DM2–DAC+

P^{**} = diferença estatística entre Grupo Controle (DM2–DAC–) e Grupo DM2 +DAC+

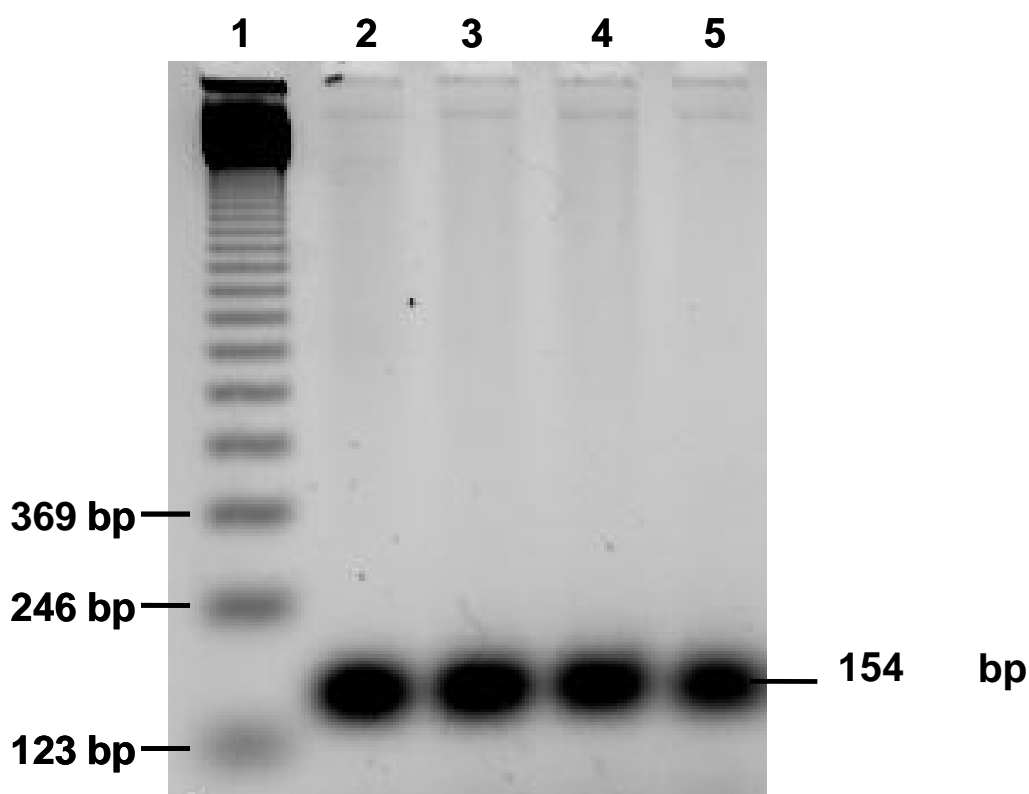
P^{***} = diferença estatística entre Grupo DM2–DAC+ e Grupo DM2 +DAC+

Comparações realizadas pelo teste “t” (ANOVA)

6.2 ANÁLISE DA VARIABILIDADE DO GENE DA APO A-V

As Figuras 7 a 10 mostram resultados típicos para os produtos de PCR e para os perfis de restrições estudados.

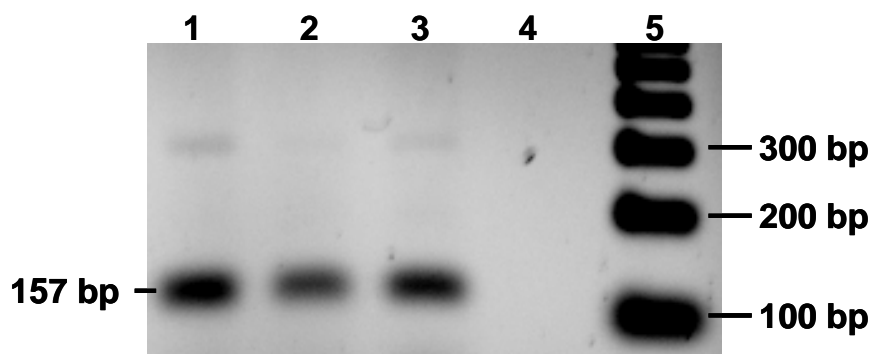
FIGURA 7 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO -1131T>C DO GENE DA APO A-V



Eletroforese em agarose 1,5%, em tampão TBE 1X (60 V, 30 mA). Os produtos de PCR (2 μ L, ~40 ng) foram corados com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizados em transiluminador UV (302 nm). As imagens foram registradas com câmera digital CCD Biochemi (UVP).

A linha 1 mostra o marcador de massa molecular (123 bp); as linhas 2 a 5 mostram produto de PCR da amplificação do gene da apo A-V contendo o polimorfismo -1131T>C. O tamanho esperado para o produto de PCR está identificado à direita do gel.

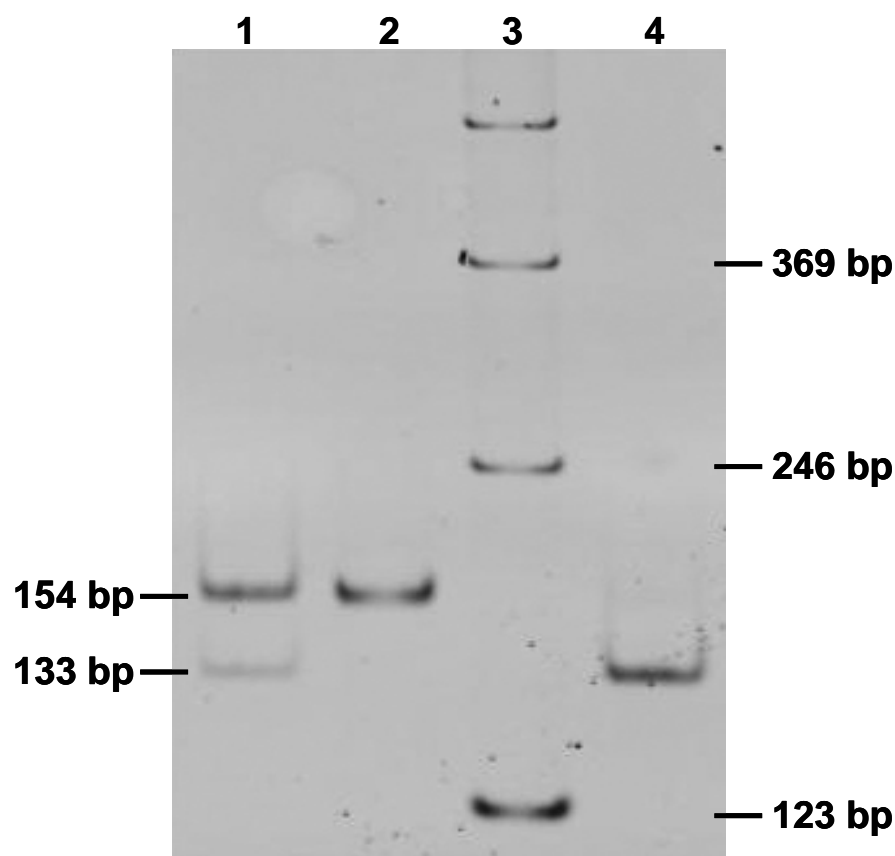
FIGURA 8 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DO POLIMORFISMO S19W DO GENE DA APO A-V



Eletroforese em agarose 1,5%, em tampão TBE 1X (60 V, 30 mA). Os produtos de PCR (2 μ L, ~30 ng) foram corados com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizados em transiluminador UV (302 nm). As imagens foram registradas com câmera digital CCD Biochemi (UVP).

A linha 5 mostra o marcador de massa molecular (100 bp); as linhas 1 a 3 mostram produto de PCR da amplificação do gene da apo A-V contendo o polimorfismo S19W; a linha 4 mostra o controle da reação (sem DNA). O tamanho esperado para o produto de PCR está identificado à esquerda do gel.

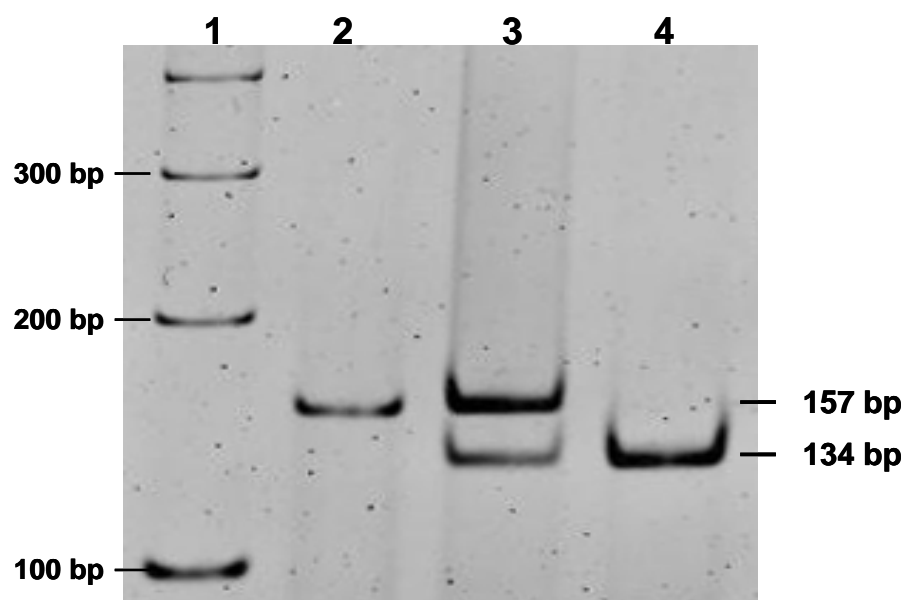
FIGURA 9 – PERFIL ELETROFORÉTICO DA PCR-RFLP DO POLIMORFISMO -1131T>C DA APOLIPOPROTEÍNA A-V



Eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 10%, em tampão TBE 1X (150 V, 51 mA). Os fragmentos de DNA (10 μ L; ~20 ng) do polimorfismo -1131T>C do gene da apo A-V foram corados com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizados em transiluminador UV (302 nm). As imagens foram registradas com câmera digital CCD Biochemi (UVP).

As linhas 1, 2 e 4 mostram o perfil de restrição para os genótipos TC, CC e TT, respectivamente. A linha 3 mostra o marcador de massa molecular (123 bp). Os tamanhos esperados para os fragmentos de restrição estão identificados à esquerda do gel.

FIGURA 10 – PERFIL ELETROFORÉTICO TÍPICO DA PCR-RFLP DO POLIMORFISMO S19W DA APOLIPOPROTEÍNA A-V



Eletroforese em gel de poliacrilamida (29:1) a 10%, em tampão TBE 1X (150 V, 51 mA). Os fragmentos de DNA (5 μ L; ~15 ng) do polimorfismo S19W do gene da apo A-V foram corados com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizados em transiluminador UV (302 nm). As imagens foram registradas com câmera digital CCD Biochemi (UVP).

A linha 1 mostra o marcador de massa molecular (100 bp); a linha 2 mostra o produto de PCR sem corte; as linhas 3 e 4 mostram o perfil de restrição para os genótipos SW e SS, respectivamente. Os tamanhos esperados para os fragmentos de restrição e o produto de PCR sem corte estão identificados à direita do gel.

A variabilidade dos polimorfismos -1131T>C e S19W do gene da apolipoproteína A-V das 206 amostras estudadas está apresentada nas Tabelas 14 a 19, que mostram as frequências dos genótipos e dos alelos, nos grupos controle, DM2-DAC+ e DM2+DAC+.

TABELA 14 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W DO GENE DA APO A-V NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=66), DM2-DAC+ (N=75) E DM2+DAC+ (N=65) E NA AMOSTRA (N=206)

Genótipos						Alelos			H-W
Apo A-V	Grupos	TT (N)	TC (N)	CC (N)	** P	T (N)	C (N)	** P	$\chi^2_{(1)}$; *P
-1131T>C	DM2-DAC-	0,849 (56)	0,136 (9)	0,015 (1)	-	0,917 (121)	0,083 (11)	-	$\chi^2=0,761$; P=0,617
	DM2-DAC+	0,853 (64)	0,120 (9)	0,027 (2)	1,000	0,913 (137)	0,087 (13)	0,709	$\chi^2=4,39$; P=0,963
	DM2+DAC+	0,831 (54)	0,138 (9)	0,031 (2)	0,817	0,900 (117)	0,100 (13)	0,544	$\chi^2=3,46$; P=0,937
	Todos	0,845 (174)	0,131 (27)	0,024 (5)	***0,976	0,910 (375)	0,090 (37)	*** 0,909	-
Apo A-V	Grupos	SS (N)	SW (N)	WW (N)	** P	S	W	** P	$\chi^2_{(1)}$; *P
S19W	DM2-DAC-	0,818 (54)	0,182 (12)	- (0)	-	0,909 (120)	0,091 (12)	-	$\chi^2=0,659$; P=0,583
	DM2-DAC+	0,947 (71)	0,053 (4)	- (0)	0,030	0,973 (146)	0,027 (4)	0,036	$\chi^2=0,056$; P=0,187
	DM2+DAC+	0,877 (57)	0,123 (8)	- (0)	0,225	0,938 (122)	0,062 (8)	0,236	$\chi^2=0,279$; P=0,403
	Todos	0,883 (182)	0,117 (24)	- (0)	*** 0,043	0,942 (388)	0,058 (24)	0,055	-

N = número de indivíduos

H-W: Equilíbrio de Hardy-Weinberg

* Valor de probabilidade "P" para o Teste do Chi-quadrado (χ^2); Grau de Liberdade (GL) = 1

** Valor de probabilidade "P" para o Teste Exato de Fisher (bidirecional), comparação com controle (DM2-DAC-)

***Valor de probabilidade "P" calculado pelo Teste RxC para os três grupos

As distribuições das frequências observadas desses genótipos nos grupos controle (DM2-DAC-), DM2-DAC+ e DM2+DAC+ não mostraram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com aquelas esperadas pela Lei de Hardy-Weinberg, o que sugere que a distribuição genotípica em todos os grupos está de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P>0,05$).

As frequências genotípicas observadas para homens e mulheres para os polimorfismos -1131T>C e S19W estão descritas nas Tabelas 23 e 24, respectivamente.

Em relação ao sexo, houve diferença significativa ($P = 0,012$) apenas para o polimorfismo -1131T>C, onde o sexo masculino representa 65,3% dos indivíduos para o genótipo TT e 5,33 para o genótipo TC + CC.

A Tabela 15 mostra a distribuição nos grupos em estudo e respectivas frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo S19W para a amostra ampliada (N=295).

TABELA 15 - FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DA AMOSTRA AMPLIADA PARA O POLIMORFISMO S19W DO GENE DA APO A-V NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=77), DM2-DAC+ (N=140) E DM2+DAC+ (N=78)

Genótipos						Alelos			H-W
Apo A-V	Grupos	SS (N)	SW (N)	WW (N)	* P	S	W	* P	* χ^2 ;P
S19W	DM2–DAC–	0,831 (64)	0,169 (13)	- (0)	-	0,916 (141)	0,084 (13)	-	χ^2 =0,65; P=0,581
	DM2–DAC+	0,921 (129)	0,089 (11)	- (0)	0,042	0,961 (269)	0,039 (11)	0,049	χ^2 =0,23; P=0,371
	DM2+DAC+	0,833 (65)	0,167 (13)	- (0)	0,971 **0,046	0,917 (143)	0,083 (13)	0,972 **0,114	χ^2 =0,64; P=0,578

* Valor de probabilidade "P" para o Teste do Chi-quadrado (χ^2); Grau de Liberdade (GL) = 1, comparação com controle (DM2-DAC-)

**Comparação entre os grupos DM2-DAC+ e DM2+DAC+, Teste do Chi-quadrado (χ^2); Grau de Liberdade (GL) = 1

Os grupos DM2-DAC+ e DM2+DAC+ foram reunidos formando um grupo designado DAC+, cujos dados estão mostrados na Tabela 16. Para a análise estatística os genótipos TC e CC foram agrupados.

TABELA 16 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DOS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W DO GENE DA APO A-V NOS GRUPOS DAC– (N=66) E DAC+ (N=140)

		Genótipos			Alelos	
Apo A-V	Grupos	TT (N)	TC (N)	CC (N)	T (N)	C (N)
-1131T>C	DAC–	0,848 (56)	0,136 (9)	0,015 (1)	0,917 (121)	0,083 (11)
	DAC+	0,842 (118)	0,129 (18)	0,029 (4)	0,907 (254)	0,093 (26)
		$\chi^2 = 0,01$; P = 0,917			$\chi^2 = 0,10$; P = 0,752	
Apo A-V	Grupos	SS (N)	SW (N)	WW (N)	S	W
S19W	DAC–	0,818 (54)	0,182 (12)	- (0)	0,909 (120)	0,091 (12)
	DAC+	0,914 (128)	0,086 (12)	- (0)	0,957 (268)	0,043 (12)
		$\chi^2 = 4,02$; P = 0,044			$\chi^2 = 3,78$; P = 0,052	

N = número de indivíduos. Para análise estatística os genótipos TC e CC foram agrupados. Valor de probabilidade “P” para o Teste do Chi-quadrado (χ^2); Grau de Liberdade (GL) = 1.

6.3 ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE HAPLÓTIPOS E GENÓTIPOS DO GENE DA APO A-V E DAC NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE DM2

As frequências dos genótipos do polimorfismo -1131T>C/S19W do gene da apo A-V encontradas nos grupos controle (DM2–DAC–), DM2–DAC+ e DM2+DAC+ estão apresentadas na Tabela 17.

TABELA 17 – DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA (%) DOS GENÓTIPOS -1131T>C/S19W DO GENE DA APO A-V NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=66), DM2-DAC+ (N=75) E DM2+DAC+ (N=65)

GENÓTIPOS		DM2-DAC- N=66		DM2-DAC+ N=75		DM2+DAC+ N=65	
-1131T>C	S19W	N	%	N	%	N	%
TT	SS	45	68,2	60	80	47	72,3
TT	SW	11	16,7	4	5,3	7	10,8
TT	WW	0	-	0	-	0	-
TC	SS	8	12,1	9	12	8	12,3
TC	SW	1	1,5	0	-	1	1,5
TC	WW	0	-	0	-	0	-
CC	SS	1	1,5	2	2,7	2	3,1
CC	SW	0	-	0	-	0	-
CC	WW	0	-	0	-	0	-

N = número de indivíduos

RxC: P=0,508; SE=0,025

As frequências haplotípicas dos polimorfismos -1131T>C/S19W do gene da apo A-V, mostradas na Tabela 18, foram obtidas com base nos genótipos apresentados na Tabela 17.

TABELA 18 – FREQUÊNCIAS ABSOLUTAS E RELATIVAS DOS DIFERENTES HAPLÓTIPOS DO GENE DA APO A-V (-1131T>C/S19W) NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=66), DM2-DAC+ (N=75) E DM2+DAC+ (N=65).

Apo A-V -1131T>C/S19W	DM2-DAC-		DM2-DAC+		DM2+DAC+		DM2-DAC- x DM2-DAC+		DM2-DAC- x DM2+DAC+		DM2-DAC+ x DM2+DAC+	
	N	%	N	%	N	%	χ^2	P*	χ^2	P*	χ^2	P*
TS	109	82,57	133	88,6	109	83,85	2,14	0,143	0,08	0,783	1,38	0,240
TW	12	9,1	4	2,7	8	6,15	5,41	0,020	0,80	0,371	2,06	0,151
CS	11	8,33	13	8,7	13	10	0,01	0,920	0,15	0,701	0,22	0,640
CW	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-
Total	132	100	150	100	130	100	**$\chi^2 = 5,58$; P = 0,232					

N = número de alelos

*Valor de probabilidade "P" para o Teste do Chi-quadrado (χ^2); grupos dois a dois; Grau de Liberdade (GL) = 1

**Valor de probabilidade "P" para o Teste do Chi-quadrado (χ^2); todos os grupos; Grau de Liberdade (GL) = 4

A Tabela 19 mostra as frequências do genótipo TT/SW e demais genótipos - 1131T/C/S19W entre os grupos em estudo.

TABELA 19 – DISTRIBUIÇÃO DAS FREQUÊNCIAS (%) DOS GENÓTIPOS TT/SW E DEMAIS GENÓTIPOS -1131T>C/S19W DO GENE DA APO A-V NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=66), DM2-DAC+ (N=75) E DM2+DAC+ (N=65)

Apo A-V -1131T>C/ S19W	DM2-DAC-		DM2-DAC+		DM2+DAC+		DM2-DAC- x DM2-DAC+	DM2-DAC- x DM2+DAC+	DM2-DAC+ x DM2+DAC+
	N	%	N	%	N	%	P*	P*	P*
TT/SW	12	18,2	4	5,3	8	12,3	0,031	0,467	0,225
Demais Genótipos	54	81,8	71	94,7	57	87,7			
TOTAL	66	100	75	100	65	100	** $\chi^2 = 5,67$; P = 0,058		

N = número de alelos

** Valor de probabilidade “P” Teste exato de Fisher (bidirecional)

**Valor de probabilidade “P” para o Teste do Chi-quadrado (χ^2) entre todos os grupos; Grau de Liberdade (GL) = 2

Realizou-se análise de correlação linear entre os polimorfismos estudados e as variáveis antropométricas e bioquímicas descritas anteriormente. Os resultados de correlação apresentando probabilidade $\leq 0,10$ estão mostrados na Tabela 20.

TABELA 20 – ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W E VARIÁVEIS ANTROPOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS COM PROBABILIDADE $\leq 0,10$

Genótipos (N)	Variáveis	*Correlação	P
-1131T>C (206)	Pressão arterial sistólica	-0,1302	0,062
S19W (295)	Ácido úrico	0,1421	0,015

*Teste de Correlação de Pearson

A distribuição da frequência do polimorfismo S19W em relação à concentração da mediana do Ácido úrico e grupos em estudo está descrita na Tabela 21.

TABELA 21 – FREQUÊNCIA DO POLIMORFISMO SS E SW EM RELAÇÃO À CONCENTRAÇÃO DA MEDIANA DO ÁCIDO ÚRICO NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=77), DM2-DAC+ (N=140) E DM2+DAC+ (N=78)

Genótipos/ Grupos	DM2-DAC- (N)		DM2-DAC+ (N)		DM2+DAC+ (N)	
Ácido úrico (mg/dL)	≤ 5,6	> 5,6	≤ 5,6	> 5,6	≤ 5,6	> 5,6
SS (%)	42 (54,5)	22 (28,6)	60 (42,9)	69 (49,3)	37 (47,4)	28 (36,0)
SW	8 (10,4)	5 (6,5)	3 (2,1)	8 (5,7)	3 (3,9)	10 (12,8)
Fisher (P)	0,760		0,345		0,034	
	Homens					
SS (%)	17 (50,0)	11 (32,4)	38 (37,3)	55 (53,9)	19 (40,4)	20 (42,6)
SW	1 (2,9)	5 (14,7)	1 (1,0)	8 (7,8)	3 (6,4)	5 (10,6)
Fisher (P)	0,078		0,147		0,706	
	Mulheres					
SS (%)	25 (58,1)	11 (25,6)	22 (56,4)	14 (35,9)	18 (58,1)	8 (25,8)
SW	7 (16,3)	0	2 (5,1)	1 (2,6)	0	5 (16,1)
Fisher (P)	0,163		1,000		0,008	

N = Número de indivíduos

Valor de probabilidade “P” Teste exato de Fisher (bidirecional)

As comparações através do teste “t” entre as concentrações de Ácido úrico relacionadas ao polimorfismo S19W mostraram significância apenas no grupo DM2+DAC+, com concentrações médias de ácido úrico de 5,8 e 7,1 mg/dL para os genótipos SS e SW, respectivamente (teste “t”=-2,23; P=0,029).

TABELA 22 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS DOS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W EM RELAÇÃO ÀS CONCENTRAÇÕES DE TRIGLICÉRIDES NOS GRUPOS DM2-DAC- (N=66), DM2-DAC+ (N=75) E DM2+DAC+ (N=65)

Genótipos	DM2-DAC- (N)		DM2-DAC+ (N)		DM2+DAC+ (N)	
Triglicérides (mg/dL)	<150	≥150	<150	≥150	<150	≥150
-1131T>C (%) TT	47 (71,2)	9 (13,6)	46 (61,4)	18 (24,0)	32 (49,2)	22 (33,8)
TC + CC	10 15,2)	0	7 (9,3)	4 (5,3)	5 (7,7)	6 (9,2)
Fisher (bidirecional)	P=0,334		P=0,721		P=0,509	
S19W (%) SS	46 (69,7)	8 (12,1)	49 (65,4)	22 (2,3)	33 (50,8)	24 (36,9)
SW	11 (16,7)	1 (1,5)	4 (5,3)	0	4 (6,2)	4 (6,1)
Fisher (bidirecional)	P=1,000		P=0,314		P=0,717	

N = Número de indivíduos

Valor de probabilidade “P” Teste exato de Fisher (bidirecional)

7 DISCUSSÃO

A Doença Arterial Coronariana e o diabetes melito tipo 2 são patologias que afetam elevada parcela da população mundial. Genes ou polimorfismos genéticos como os SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) têm sido pesquisados na procura de associações com estas doenças ou suas complicações

O gene da apo A-V, recentemente identificado, tem papel chave na determinação das concentrações plasmáticas de triglicérides. Devido à hipertrigliceridemia ser um fator de risco independente para DAC, a determinação de fatores que afetem sua incidência em diversas populações é de considerável importância e tem sido alvo de intensa pesquisa.

Neste estudo, os polimorfismos de único nucleotídeo no gene da apo A-V, -1131T>C da região promotora e o S19W do exon 2, são pesquisados em uma população essencialmente euro-brasileira (93%), caracterizada quanto à presença de DAC por cineangiocoronariografia e separada em grupos com a presença ou não de diabetes melito tipo 2. Este estudo também inclui um grupo controle (DM2-DAC-), caracterizado por indivíduos que não apresentaram alterações significativas no procedimento angiográfico (estenose < 50%) e sem alterações dos níveis glicêmicos. Estes pacientes estavam vinculados à clínica cardiológica devido a alterações no perfil lipídico, hipertensão arterial, histórico familiar para DAC ou outros fatores associados a risco cardiovascular.

7.1 DADOS ANTROPOMÉTRICOS E BIOQUÍMICOS

A distribuição racial da amostra, preponderando euro-brasileiros (92,8%), reflete a população atendida pelo Hospital Cardiológico Costantini, fornecedor de cerca de 87% da amostra presente neste estudo.

A distribuição de freqüências por sexo e fatores de risco da amostra (Tabela 11) mostra uma prevalência ($P = 0,024$) de mulheres no grupo controle (DM2-DAC-) em relação ao grupo DM2-DAC+; este, no entanto não difere do grupo DM2+DAC+. O uso do tabaco é significativamente menor ($P = 0,003$) no grupo controle quando comparado ao grupo DM2-DAC+ e não difere do grupo DM2+DAC+. Esta

característica reflete a associação do tabagismo com a DAC, sendo que pacientes com DM2, devido ao tratamento contínuo são desestimulados ao fumo por este ser um fator de risco adicional ao diabético. A presença de hipertensão arterial supera os 36% em todos os grupos e ressalta a importância deste fator de risco na população em estudo. Os grupos controle e DM2+DAC+ apresentaram diferenças significativas ($P = 0,044$) neste quesito, ressaltando a maior taxa de pressão arterial entre diabéticos, uma conhecida característica secundária desta patologia. PIEGAS et al. (2003) ao estudarem fatores de risco para o infarto do miocárdio, uma das principais complicações da DAC, em uma população brasileira, reportaram o tabagismo (mais que cinco cigarros por dia) como um dos principais fatores de risco independente, seguido em ordem de importância da glicose ≥ 126 mg/dL, portanto em concordância com os dados obtidos para os indivíduos com DAC presentes na amostra em estudo. O histórico familiar para DAC não diferiu significativamente entre os grupos em estudo ($P > 0,600$), e está associado a mais de 40% de todos os participantes deste estudo. A elevada prevalência deste fator de risco não modificável é comum em estudos com desenho amostral semelhante ao aqui apresentado (PHILLIPS et al., 2004).

A distribuição de idade entre os grupos (Tabela 12) mostra que o grupo controle tem idade média (59 anos) significativamente menor que os grupos DM2-DAC+ (63,6 anos, $P = 0,013$) e DM2+DAC+ (64,8 anos; $P < 0,001$). Este achado é compatível à estabelecida associação de aumento de risco para DAC e diabetes concomitante ao aumento da idade (SHARMA, 2003). Outra possibilidade aventada para o grupo controle apresentar idade menor em relação aos demais pode estar relacionada à procura de assistência médica precoce, associada a maior informação do paciente sobre condutas preventivas.

Os dados das variáveis antropométricas e bioquímicas (Tabela 13) mostram que as médias das pressões arteriais sistólica e diastólica não apresentaram diferença significativa entre os três grupos, assim como as concentrações séricas médias de colesterol total, LDL-C, apo A-I, apo B e ácido úrico. Embora os elementos descritos sejam marcadores de risco para DAC, a não diferenciação entre o grupo controle e os demais pode refletir a intensa terapia medicamentosa anti-hipertensiva e hipolipemiante a que estes pacientes estejam submetidos, achado usual nos pacientes que atendem à rotina das clínicas de cardiologia.

Houve diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparadas as médias das variáveis IMC, HbA_{1c}, glicose, HDL-C, TG, logaritmo de TG, e o logaritmo da relação TG/HDL-C entre os grupos controle, DM2-DAC+ e DM2+DAC+.

As médias de IMC foram significativamente diferentes ($P < 0,05$) entre os três grupos. Os valores de IMC aumentaram progressivamente na ordem: controle, DM2-DAC+ e no grupo com diabetes tipo 2, com valores médios de 23,9; 26,1 e 27,7 kg/m², respectivamente. Este achado reflete a associação do aumento ponderal com o risco para DAC, fato bem estabelecido na literatura (SHARMA, 2003), e reforça a conhecida relação entre o diabetes melito tipo 2 com a obesidade (LAZAR, 2005; YOLOGLU et al., 2005).

As concentrações médias de glicose e de HbA_{1c}, respectivamente 157,4 mg/dL e 7,7%, dos indivíduos do grupo DM2+DAC+ foram significativamente maiores ($P < 0,001$) em comparação aos demais grupos. As concentrações reportadas no grupo com diabetes para HbA_{1c}, um marcador do controle glicêmico, refletem uma população com controle da glicemia aquém dos parâmetros recomendados ($HbA_{1c} \leq 7,0\%$), como preconizado em Consensos Nacionais e Internacionais (Consenso Brasileiro sobre Diabetes, 2002; American Diabetes Association, 2005). Analisados em conjunto, os níveis de glicemia e HbA_{1c} observados neste estudo, refletem também a adequada classificação da amostra, aonde apenas um grupo apresenta diabetes.

Os valores das concentrações médias de HDL-C foram significativamente menores ($P < 0,05$) nos grupos DM2-DAC+ e DM2+DAC+ em comparação ao grupo controle, sendo que os dois últimos não diferiram entre si. Este resultado reflete a associação inversa do HDL-C com a DAC (YOLOGLU et al., 2005). Deve-se ressaltar que não foi observada uma redução da apo A-I na mesma magnitude e significância que o HDL-C. Sendo a apo A-I, a principal apolipoproteína da fração HDL, sua concentração sérica está altamente correlacionada com o HDL-C (FRANCIS e FROHLICH, 2001). A discriminação dos grupos com DAC em comparação ao grupo controle pelo HDL-C, sem a esperada correspondência da apo A-I, pode sugerir que para a população em estudo o HDL-C seja um parâmetro mais sensível e, portanto, recomendado.

As concentrações médias de triglicérides no grupo controle foram significativamente menores em relação ao grupo contendo diabéticos (105,8 vs

164,4 mg/dL: $P < 0,001$). O grupo DM2+DAC+ também apresentou concentrações superiores de triglicérides em relação ao grupo DM2-DAC+ (164,4 vs 130,6 mg/dL; $P = 0,023$). Este achado reflete a já descrita elevação nas concentrações de triglicérides associadas à DAC e em particular ao diabetes tipo 2 (TAN et al., 2001).

A relação $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ apresentada por DOBIASOVÁ e FROHLICH (2001) como um índice aterogênico e correlacionado com o tamanho da partícula de LDL, foi capaz de discriminar significativamente ($P < 0,05$) todos os grupos em estudo. Valores crescentes desta relação do grupo controle, DM2-DAC+ e DM2+DAC+, foram, respectivamente, 0,32; 0,45; 0,56. Os valores observados para relação $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ foram superiores a 0,1, limite proposto por FROHLICH e DOBIÁSOVÁ (2003) relacionado com partículas de LDL pequenas e densas ($\leq 25,5$ nm), de maior aterogenicidade. A sensibilidade na discriminação entre os grupos em estudo sugere que a relação $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ pode ser um parâmetro útil na avaliação de indivíduos com as características presentes neste estudo.

7.2 VARIABILIDADE GENÉTICA

Os polimorfismos em estudo foram caracterizados pela técnica de PCR-RFLP utilizando oligonucleotídeos iniciadores que induzem sítios de restrição para as enzimas *Taq I* e *Mse I*. As figuras 7 e 8, respectivamente, mostram os perfis eletroforéticos para os produtos de PCR dos polimorfismos -1131T>C e S19W do gene da apo A-V, evidenciando a quantidade e qualidade (ausência de bandas inespecíficas) adequadas, obtidas com os protocolos apresentados em Materiais e Métodos.

A separação dos fragmentos de DNA da restrição, por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% e visualização com brometo de etídeo, permitiram a identificação inequívoca dos genótipos, como mostrado nas Figuras 9 e 10, respectivamente para os polimorfismos -1131T>C e S19W. Não foram detectados problemas com a PCR-RFLP relacionados a restrições parciais com o procedimento empregado.

As frequências genotípicas e alélicas (Tabela 14) para o polimorfismo -1131T>C do gene da apo A-V não mostraram diferenças estatisticamente

significativas entre os 3 grupos estudados, quando comparado dois a dois. No entanto, para o polimorfismo S19W, houve diferença significativa apenas nas frequências genotípicas ($P = 0,030$) e alélicas ($P = 0,036$) entre os grupos controle e DM2-DAC+. Quando comparadas as frequências genotípicas entre os três grupos, somente o polimorfismo S19W apresentou diferença significativa ($P = 0,043$). Quanto ao sexo, as frequências genotípicas diferiram significativamente ($P = 0,012$) apenas no grupo DM2-DAC+ relacionado ao polimorfismo -1131T>C, apresentando uma redução na frequência do genótipo -1131TT nas mulheres em relação aos homens (20% vs 65,3%). Para verificar a influência da etnia nas frequências genotípicas e alélicas, análises incluindo apenas euro-brasileiros ($N = 191$) foram realizadas e não mostraram diferenças significativas quando comparado a amostra total com os grupos estudados.

Como a frequência para o alelo raro do polimorfismo S19W apresentou-se baixa, não sendo detectado nenhum homozigoto W19W, novos indivíduos foram analisados para este polimorfismo, aumentando a amostra inicial em cerca de 40%. A distribuição genotípica e alélica para o polimorfismo S19W com a amostra ampliada (Tabela 15) apresentou resultados semelhantes aos anteriormente descritos, sendo que nesta amostra foi possível evidenciar uma diferença significativa entre os grupos DM2-DAC+ e DM2+DAC+ ($P = 0,046$). Mesmo com a ampliação da amostra nenhum homozigoto para o genótipo W19W foi encontrado, confirmando as frequências observadas por PENNACCHIO et al. (2002) e outros autores (Tabela 2).

Os grupos DM2-DAC+ e DM2+DAC+ foram reunidos formando um grupo designado DAC+ e comparados com o grupo controle, aqui designado DAC-, para verificar se o aumento da amostra de indivíduos com DAC, sem a discriminação do diabetes poderia afetar as distribuições genotípicas e alélicas (Tabela 16). Nesta nova distribuição da amostra, o polimorfismo -1131T>C não apresentou diferenças entre os grupos e a mutação S19W manteve a diferença significativa ($P = 0,044$), de forma semelhante à observada anteriormente nas Tabelas 14 e 15. Este achado reforça a observação que as frequências genotípicas e alélicas referentes ao polimorfismo S19W realmente são significativamente associadas a DAC com redução na frequência do genótipo SW, em especial quando o diabetes tipo 2 não está presente.

Para facilitar as análises comparativas com outros estudos, as Tabelas 1 e 2 apresentadas na Revisão Bibliográfica, foram modificadas, incluindo as frequências genóticas observadas no presente estudo, bem como a significância das comparações (Tabelas 23 e 24). É relevante ressaltar que em algumas publicações utilizadas na comparação, a caracterização da amostra não está bem estabelecida quanto à composição étnica e patologias associadas.

7.3 ANÁLISES COMPARATIVAS PARA OS POLIMORFISMOS -1131T>C E S19W

A Tabela 23 mostra a comparação realizada entre o presente estudo e os outros trabalhos para o polimorfismo -1131T>C, sendo que a comparação foi realizada empregando o grupo estudado neste trabalho de melhor semelhança ao reportado na literatura.

Os genótipos que contêm o alelo raro (TC + CC) são mais freqüentes na população oriental do que nas demais populações (ENDO et al., 2002; NABIKI et al., 2002; BAUM et al., 2003; LI et al., 2004), sendo significativamente maiores do que o observado no presente estudo.

As frequências dos genótipos que apresentaram o alelo raro do polimorfismo -1131T>C entre homens e mulheres do presente estudo foram, significativamente menores ($P < 0,05$), do que as encontradas por PENNACCHIO et al. (2002) para homens e mulheres afro-americanos e hispânicos. Não houve diferença entre os achados de PENNACCHIO et al. (2002) e este trabalho para a população caucasiana.

Não houve diferença nas frequências genóticas entre as populações: homens ingleses (TALMUD et al. 2002; TALMUD et al., 2004), caucasiana canadense (LEE et al., 2004), tunísica (CHAABA et al., 2005) e a população deste estudo.

Para a população húngara pesquisada por SZALAI et al. (2004), a frequência dos genótipos TC + CC foi maior no grupo portador de DAC quando comparada ao nosso grupo DM2-DAC+. No entanto, quando comparados o grupo controle deste estudo com sua contraparte húngara, as frequências destes genótipos foram significativamente menores nos últimos.

TABELA 23 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO - 1131T>C DO GENE DA APO A-V NAS DIVERSAS POPULAÇÕES ESTUDADAS E COMPARADAS COM O PRESENTE ESTUDO

População	Genótipos			Comparação	Estatística	Referências
	TT(N)	TC(N)	CC(N)			
Homens	0,869 (106)	0,098 (12)	0,033 (4)	-----	PRESENTE ESTUDO	
Mulheres	0,802 (69)	0,186 (16)	0,012 (1)	-----		
Toda a população	0,841 (175)	0,135 (28)	0,024 (5)	-----		
Controle	0,848 (56)	0,136 (9)	0,015 (1)	-----		
DM2-DAC+	0,853 (64)	0,120 (9)	0,027 (2)	-----		
DM2+DAC+	0,831 (54)	0,138 (9)	0,031 (2)	-----		
Mulheres afro-americanas	0,777 (537)	0,213 (147)	0,010 (7)	Mulheres	$\chi^2=3,81$; P=0,049	PENNACCHIO et al., 2002
Homens afro-americanos	0,772 (376)	0,218 (106)	0,010 (5)	Homens	$\chi^2=19,49$; P<0,001	
Mulheres hispânicas	0,668 (125)	0,310 (58)	0,021 (4)	Mulheres	$\chi^2=5,13$; P=0,023	
Homens hispânicos	0,741 (103)	0,245 (34)	0,014 (2)	Homens	$\chi^2=6,66$; P=0,009	
Mulheres caucasianas	0,866 (311)	0,134 (48)	0	Mulheres	$\chi^2=2,28$; P=0,131	
Homens caucasianos	0,872 (286)	0,128 (42)	0	Homens	$\chi^2=0,01$; P=0,930	
Homens ingleses	0,883 (2257)	0,111 (285)	0,006 (14)	Homens	$\chi^2=0,23$; P=0,635	TALMUD et al., 2002
Japonesa	0,418 (425)	0,477 (485)	0,105 (107)	Toda a população	$\chi^2=123,91$; P<0,001	NABIKA et al., 2002
Japonesa	0,408 (225)	0,476 (263)	0,116 (64)	Toda a população	$\chi^2=114,00$; P<0,001	ENDO et al., 2002
Húngara	0,805 (174)	0,172 (53)	0,023 (7)	DM2-DAC+	$\chi^2=3,87$; P=0,049	SZALAI et al., 2004
	0,894 (277)	0,100 (31)	0,006 (2)	Controle	$\chi^2=5,08$; P=0,024	
Chinesa	0,404 (135)	0,494 (165)	0,102 (34)	Toda a população	$\chi^2=100,03$; P<0,001	LI et al, 2004
Caucasianos Canadenses	0,848 (375)	0,138 (61)	0,014 (6)	Toda a população	$\chi^2=0,05$; P=0,815	LEE et al., 2004
Homens ingleses	0,818 (242)	0,182 (54)		Homens	$\chi^2=1,63$; P=0,202	TALMUD et al., 2004
Tunísica	0,747 (74)	0,211 (21)	0,040 (4)	Controle	$\chi^2=0,79$; P=0,374	CHAABA et al., 2005
	0,719 (41)	0,263 (15)	0,018 (1)	DM2-DAC+	$\chi^2=3,58$; P=0,058	
	0,703 (52)	0,230 (17)	0,067 (5)	DM2+DAC+	$\chi^2=3,13$; P=0,076	
Chinesa	0,490 (246)	0,422 (212)	0,088 (44)	Controle	$\chi^2=28,79$; P<0,001	LIU et al., 2005
	0,375 (181)	0,468 (226)	0,157 (76)	DM2-DAC-	$\chi^2=60,38$; P<0,001	

N = número de indivíduos. Para análise estatística os genótipos TC e CC foram agrupados.

A Tabela 24 mostra a comparação realizada entre o presente estudo e outros trabalhos para o polimorfismo S19W, sendo que a amostra utilizada para comparação foi a que mais se aproximou da utilizada por cada autor.

TABELA 24 – FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS DO POLIMORFISMO S19W DO GENE DA APO A-V NAS DIVERSAS POPULAÇÕES ESTUDADAS E COMPARADAS COM O PRESENTE ESTUDO

População	Genótipos			Comparação	Estatística	Referências
	SS(N)	SW(N)	WW(N)			
Homens	0,878 (166)	0,122 (23)	0	-----		PRESENTE ESTUDO
Mulheres	0,874 (104)	0,126 (15)	0	-----		
Toda a população	0,877 (270)	0,123 (38)	0	-----		
Controle	0,831 (64)	0,169 (13)	0	-----		
DM2-DAC+	0,921 (129)	0,079 (11)	0	-----		
DM2+DAC+	0,833 (65)	0,167 (13)	0	-----		
Mulheres afro-americanas	0,861 (707)	0,132 (108)	0,007 (6)	Mulheres	$\chi^2=0,14$; $P=0,704$	PENNACCHIO et al., 2002
Homens afro-americanos	0,865 (494)	0,131 (75)	0,004 (2)	Homens	$\chi^2=0,22$; $P=0,642$	
Mulheres hispânicas	0,743 (185)	0,229 (57)	0,028 (7)	Mulheres	$\chi^2=8,19$; $P=0,042$	
Homens hispânicos	0,696 (119)	0,292 (50)	0,012 (2)	Homens	$\chi^2=18,11$; $P<0,001$	
Mulheres caucasianas	0,874 (386)	0,122 (54)	0,004 (2)	Mulheres	$\chi^2=0,00$; $P=0,980$	
Homens caucasianos	0,892 (362)	0,108 (44)	0	Homens	$\chi^2=0,23$; $P=0,632$	
Homens ingleses	0,890 (2223)	0,105 (263)	0,004 (11)	Homens	$\chi^2=0,26$; $P=0,613$	TALMUD et al., 2002
República Tcheca	0,859 (2198)	0,138 (352)	0,003 (9)	Controle	$\chi^2=0,72$; $P=0,396$	VRABLÍK et al., 2003
Caucasianos Canadenses	0,875 (364)	0,115 (48)	0,010 (4)	Toda a população	$\chi^2=0,00$; $P=0,947$	LEE et al., 2004
Inglesa	0,859 (268)	0,141 (44)		Homens	$\chi^2=0,38$; $P=0,538$	TALMUD et al., 2004
Chinesa	1,000 (502)	0	0	Controle	$\chi^2=86,70$; $P<0,001$	LIU et al., 2005
	0,909 (439)	0,089 (43)	0,002 (1)	DM2-DAC+	$\chi^2=0,21$; $P=0,645$	
Norte Irlandesa	0,920 (480)	0,080 (41)	0	Controle	$\chi^2=4,48$; $P=0,034$	WRIGHT et al., 2005

N = número de indivíduos. Para análise estatística os genótipos SS e SW foram agrupados.

As freqüências dos genótipos SW + WW foram significativamente maiores nos homens e mulheres hispânicos pesquisados por PENNACCHIO et al. (2002) em relação aos homens e mulheres deste presente estudo. Com relação às demais populações estudadas por PENNACCHIO et al. (2002), afro-americanos e caucasianos, não houve diferença significativa quando comparadas à amostra deste trabalho.

Não houve diferença significativa nas freqüências genotípicas do polimorfismo S19W entre a população de homens ingleses (TALMUD et al., 2002; TALMUD et al., 2004), tchecos (VRABLÍK et al., 2003) e caucasianos canadenses (LEE et al., 2004), quando comparadas à amostra deste estudo.

As freqüências dos genótipos contendo o alelo raro W do polimorfismo S19W, de modo dispar ao observado para o polimorfismo -1131T>C, foram menores na população chinesa (LIU et al., 2005) em relação à população deste estudo, para o grupo controle, ressaltando que os autores citados detectaram somente homozigotos SS neste grupo.

Na população controle norte irlandesa estudada por WRIGHT et al. (2005) as freqüências dos genótipos contendo o alelo raro, do polimorfismo S19W, foram significativamente maiores do que no presente estudo, observando-se que nesta população os referidos autores não encontraram nenhum homozigoto WW a semelhança deste trabalho.

7.4 ESTUDO DE HAPLÓTIPOS

A distribuição de freqüências dos genótipos -1131T>C/S19W para o estudo de haplótipos está mostrada na Tabela 17, sendo que os valores observados para os genótipos não são diferentes entre os grupos estudados ($P = 0,508$)

Comparando-se as freqüências dos haplótipos (Tabela 18) dos polimorfismos -1131T>C/S19W do gene da apo A-V, verificou-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os 3 grupos estudados ($\chi^2 = 5,58$; $P = 0,232$). Ao se analisar os grupos controle, DM2-DAC+ e DM2+DAC+, dois a dois, as freqüências destes haplótipos também não foram diferentes, exceto para o haplótipo TW ($\chi^2 = 5,41$; $P = 0,020$) entre os grupos controle e DM2-DAC+. Os estudos que

descreveram freqüências haplotípicas foram realizados a partir de quatro ou mais polimorfismos, impossibilitando comparações com o nosso trabalho. A partir deste dado, investigou-se a freqüência do genótipo TT/SW e demais genótipos -1131T>C/S19W entre os grupos em estudo, mostrado na Tabela 19.

Comparando-se as freqüências do genótipo TT/SW com os demais genótipos -1131T>C/S19W do gene da apo A-V, nos 3 grupos estudados, a distribuição genotípica não foi estatisticamente significativa ($\chi^2_{(2)} = 5,67$; $P=0,058$). Analisando-se os grupos estudados, dois a dois, pelo Teste de Fisher (bidirecional), a distribuição do genótipo TT/SW, comparado com os demais genótipos 1131T>C/S19W do gene da apo A-V, mostrou-se estatisticamente diferente entre os grupos controle e o DM2-DAC+ ($P = 0,031$), conforme a Tabela 19. Portanto a freqüência do genótipo TT/SW foi significativamente menor no grupo com DAC e sem diabetes quando comparado a grupo controle.

7.5 ANÁLISES DE CORRELAÇÃO E OUTRAS COMPARAÇÕES

Através da análise de correlação linear de Pearson (Tabela 20) foram comparadas as variáveis antropométricas e bioquímicas com os polimorfismos em estudo. Apenas o ácido úrico mostrou correlação positiva e significativa (0,1421; $P = 0,015$) para o polimorfismo S19W quando se analisou a população ampliada ($N=295$). Com base neste achado, a distribuição das freqüências genotípicas para os polimorfismos em estudo foram realizadas.

As freqüências para os polimorfismos -1131T>C e S19W foram analisadas utilizando como discriminador o valor da mediana (5,6 mg/dL) da concentração do ácido úrico, na população em estudo, por permitir separar a amostra de forma homogênea em termos de número de indivíduos e conseqüentemente maior confiabilidade nos resultados (Tabela 21). Foi observada diferença significativa ($P = 0,034$) apenas no grupo com diabéticos tipo 2, evidenciando neste um aumento do genótipo SW com o aumento do ácido úrico. A subclassificação deste estudo, discriminando nos grupos homens e mulheres, mostrou que as mulheres no grupo com diabetes tipo 2 apresentaram diferença marcante ($P = 0,008$), estando o genótipo SW em maior freqüência, associado à maior concentração de ácido úrico.

HAYDEN e TYAGI (2004), revisaram estudos referentes ao papel do ácido úrico em relação à doença cardiovascular, doença renal e hipertensão, mostrando que concentrações de ácido úrico acima de 4 mg/dL devem ser consideradas um sinal de alerta em pacientes com risco cardiovascular. A hiperuricemia não aparenta apresentar um papel causal no desenvolvimento da DAC, sendo provavelmente seu efeito associado com outros fatores de risco (CULLETON et al., 1999). YOO et al. (2005) relataram que as concentrações de ácido úrico foram correlacionadas independentemente com a hipertensão arterial, resistência à insulina e fatores de risco para síndrome metabólica. Com base nos dados obtidos neste trabalho, é possível sugerir uma associação entre a maior prevalência do genótipo SW em pacientes diabéticos tipo 2 com a concentração sérica elevada de ácido úrico. Também, a correlação do genótipo SW com o ácido úrico elevado, pode estar refletindo a já descrita associação entre este genótipo e as concentrações séricas de TG, os quais guardam uma correlação direta com o ácido úrico (YOO et al., 2005). Novos estudos devem ser conduzidos para esclarecer estes achados.

A importância do gene da apo A-V para a determinação das concentrações séricas de TG foi primeiramente determinada por PENNACCHIO et al. (2001) em camundongos transgênicos e nocauteados. Desde então diversos trabalhos têm associado polimorfismos do gene da apo A-V e concentrações séricas de TG em diversas populações, sendo os polimorfismos -1131T>C e S19W os mais estudados.

Embora a associação dos polimorfismos -1131T>C e S19W e o aumento na concentração sérica de TG já tenha sido estabelecida, neste trabalho não houve diferença significativa entre este analito, os polimorfismos e os grupos estudados (Tabela 22). Isso pode refletir a característica da amostra, onde majoritariamente os indivíduos estão submetidos à intensa terapia com drogas hipolipemiantes. Portanto, as concentrações de TG na amostra em estudo não são comparáveis à maioria dos trabalhos publicados, onde os pacientes estudados não estão sob influência medicamentosa. Como exemplos, podem ser citados os trabalhos que obtiveram correlação entre os polimorfismos em estudo e aumento de TG e excluíram da amostra, pacientes em uso de drogas hipolipemiantes: LIU et al. (2005) em chineses; ENDO et al. (2002) em crianças japonesas, VARABLÍK et al. (2003) em tchecos, SZALAI et al. (2004) em húngaros.

Em síntese, este trabalho mostra que as frequências genotípicas e alélicas dos polimorfismos observados neste estudo podem apresentar-se significativamente diferentes de outras populações, em especial quando se compara com orientais. Os dados apresentados são inéditos para uma população brasileira com caracterização angiográfica.

8 CONCLUSÕES

- Entre as variáveis antropométricas e bioquímicas analisadas o IMC e o $\log(\text{TG}/\text{HDL-C})$ foram as únicas a apresentar diferenças significativas entre os três grupos, indicando que estas medidas foram marcadores sensíveis e discriminantes para a população em estudo.
- As frequências alélicas ($P = 0,036$) e genóticas ($P = 0,030$) para o polimorfismo S19W foram significativamente menores para o genótipo SW no grupo DM2-DAC+ em comparação ao grupo controle. Ampliando a amostra ($N=295$), a frequência do genótipo SW também se mostrou significativamente menor no grupo DM2-DAC+ comparado ao grupo DM2+DAC+.
- A frequência do haplótipo TW dos polimorfismos -1131T>C/S19W do gene da apo A-V foi significativamente maior ($P = 0,020$) no grupo controle em relação ao grupo DM2-DAC+
- O genótipo TT/SW dos polimorfismos -1131T>C/S19W do gene da apo A-V comparado aos demais genótipos, foi significativamente maior ($P = 0,031$) no grupo controle em relação ao grupo DM2-DAC+.
- As concentrações séricas de ácido úrico foram correlacionadas significativamente ($0,1421$; $P = 0,010$) com os genótipos do polimorfismo S19W quando a análise foi realizada com a amostra ampliada ($N = 295$).
- A frequência do genótipo SW foi significativamente maior ($P = 0,034$) apenas no grupo DM2+DAC+ quando a concentração média de ácido úrico foi $\geq 5,6$ mg/dL e comparada com concentrações $< 5,6$ mg/dL, sendo as mulheres as responsáveis pela diferença significativa observada.
- Não houve diferença significativa entre as concentrações de triglicérides e os polimorfismos em estudo.

REFERÊNCIAS

III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose. **Arq Bras Cardiol**, v.77; supl. III, 2001. p.5-7;13-19;26-27;32-35;42.

AALTO SETALA, K.; FISHER, E.A.; CHEN, X.; CHAJEK SHAUL, T.; HAYEK, T.; ZECHNER, R.; WALSH, A.; RAMAKRISHNAN, R.; GINSBERG, H.N.; BRESLOW, J. L. Mechanism of hypertriglyceridemia in human apolipoprotein (apo) CIII transgenic mice. Diminished very low density lipoprotein fractional catabolic rate associated with increased apo CIII and reduced apo E on the particles . **J Clin Invest**, v. 90, p. 1889-1900, 1992.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of *Diabetes mellitus*. **Diabetes Care**, v.28, supl.1, p.S37-S42, 2005.

BARRET-CONNOR, E.L.; COHN, B.A.; WINGARD, D.L.; EDELSTEIN, S.L. Why is diabetes mellitus a stroger risk factor for fatal ischemic heart disease in women than in men? The Rancho Bernardo study. **JAMA**, v.265, p.627-631, 1991.

BAUM, L.; TOMLINSON, B.; THOMAS, G.N. *APOA5* -1131T>C polymorphism is associated with triglyceride levels in Chinese men. **Clinical Genetics**. V. 63, p. 377-379, 2003.

BECKSTEAD, J.A.; ODA, M.N.; MARTIN, D.D.O.; FORTE, T.M.; BIELICKI, J.K.; BERGER, T.; LUTY, R.; KAY, C.M.; RYAN, R.O. Structure-function studies of human apolipoprotein A-V: a regulator of plasma lipid homeostasis. **Biochemistry**, v. 42, p. 9416-9423, 2003.

BEISIEGEL, U.; UTERMANN, G. An apolipoprotein homolog of rat apolipoprotein A-IV in human plasma. **Eur J Biochem**, v. 93, p. 601-608, 1979.

BERNARD, S.; CHARRIERE, S.; CHARCOSSET, M.; BERTHEZENE, F.; MOULIN, P.; SASSOLAS, A. Relation between XbaI apolipoprotein B gene polymorphism and cardiovascular risk in a type 2 diabetic cohort. **Atherosclerosis**, v.175, p.177-181, 2004.

BISGAIER, C.L.; SACHDEV, O.P.; MEGNA, L.; GLICKMAN, R.M. Distribution of apolipoprotein A-IV in human plasma. **J Lipid Res**, v. 26, p. 11-25, 1985.

BRAND, F.N.; MCGEE, D.L.; KANNEL, W.B.; STOKES, J. 3d; CASTELLI, W.P. Hyperuricemia as a risk factor of coronary heart disease: the Framingham study. **Am J Epidemiol**, v.121, p. 11-18, 1985.

BRUNS, G.A.; KARATHANASIS, S.K.; BRESLOW, J.L. Human apolipoprotein A-I-C-III gene complex is located on chromosome 11. **Arteriosclerosis**, v. 4, p. 97-102, 1984.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; TIETZ, N.W. **Tietz textbook of clinical chemistry**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 3ed, 1999.

CHAABA, R.; ATTIA, N.; HAMMAMI, S.; SMAOUI, M.; MAHJOUB, S.; HAMMAMI, M.; MASMOUDI, A.S. Association of SNP3 polymorphism in the apolipoprotein A-V gene with plasma triglyceride in Tunisian type 2 diabetes. **Lipids in Health and Disease**, v.4, n.1, 2005. Disponível em: <<http://www.lipidworld.com/content/4/1/>> Acessado em: 10 jun 2005.

CHANNON, K.M.; WATKINS, H. Coronary artery disease genetics: bigger is better. **Eur Heart J**, v. 25, p. 900-901, 2004.

CHAPMAN, M.J.; GUERIN, M.; BRUCKERT, E. Atherogenic, dense and low-density lipoproteins. Pathophysiology and new therapeutic approaches. **Eur Heart J**, v.19 (suppl. A), p. A24-A30, 1998.

CLAVEY, V.; LESTAVEL-DELATTRE, S.; COPIN, C.; BARD, J.M.; FRUCHART, J.C. Modulation of lipoprotein B binding to the LDL receptor by exogenous lipids and apolipoproteins CI, CII, CIII and E. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 15, p. 963-971, 1995.

Consenso Brasileiro Sobre Diabetes 2002. Diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento diabetes melito tipo 2. **Sociedade Brasileira de Diabetes**. Rio de Janeiro: Diagraphic, 2002.

CULLETON, B.F.; LARSON, M.G.; KANNEL, W.B.; LEVY, D. Serum uric acid and risk for cardiovascular disease and death: The Framingham Heart Study. **Ann Intern Med**, v.131, p.7-13, 1999.

Diretrizes de Doença Coronariana Crônica Angina Estável. **Arq Bras Cardiol**, v.83, supl. II, p.17-18, 2004

DOBIÁSOVÁ, M. FROHLICH, J. The plasma parameter log(TG/HDL-C) as na atherogenic index: correlation with lipoprotein particle size and esterification rate in apoB-lipoprotein_depleted plasma (FER_{HDL}). **Clin Biochem**, v.34, p.583-588, 2001.

ENDO, K.; YANAGI, H.; ARAKI, J.; HIRANO, C.; YAMAKAWA-KOBAYASHI, K.; TOMURA, S. Association found between the promoter region polymorphism in the apolipoprotein A-V gene and the serum triglyceride level in Japanese schoolchildren. **Hum Genet**, v. 111, p. 570-572, 2002.

EXCOFFIER, L.; SCHNEIDER, S. **Arlequin: ver. 3.0**: an integrated software package for population genetics data analysis. Bern, 2005. Disponível em: <<http://anthro.unige.ch/arlequin/>> Acesso em: 01 nov 2005.

FIDGE, N. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. **J Lipid Res**, v.40, p.187-201, 1999.

FRANCIS, M.C.; FROHLICH, J.J. Coronary artery disease in patients at low risk – apolipoprotein AI as an independent risk factor. **Atherosclerosis**, v.155, p.165-170, 2001.

FREEDMAN, D.S.; WILLIAMSON, D.F.; GUNTER, E.W.; BYERS, T. Relation of serum uric acid to mortality and ischemic heart disease. The NHANES I epidemiologic follow-up study. **Am J Epidemiol**, v. 141, p.637-644, 1995.

FROHLICH, J.; DOBIÁSOVÁ, M. Fractional esterification of cholesterol and ratio of triglycerides to HDL-cholesterol are powerful predictors of positive findings on coronary angiography. **Clin Chem**, v.49, p.1873-1880, 2003.

FRUCHART, J.C.; DURIEZ, P. HDL and triglyceride as therapeutic targets. **Curr Opin Lipidol**, v.13 (6), p.605-616, 2002.

FRUCHART-NAJIB, J.; BAUGÉ, E.; NICULESCU, L-S.; PHAM, T.; THOMAS, B.; ROMMENS, C.; MAJD, Z.; BREWER, B.; PENNACCHIO, L.A.; FRUCHART, J-C. Mechanism of triglyceride lowering in mice expressing human apolipoprotein A5. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 319, p.397-404, 2004.

GINSBERG, H.N.; TUCK, C. Diabetes and dyslipidemia. **Heart Fail Monit.**, v.2, n.1, p.14-20, 2001.

GROENENDIJK, M.; CANTOR, R.M.; DE BRUIN, T.W.A.; DALLINGA-THIE, G.M. The apoAI-CIII-AIV gene cluster. **Atherosclerosis**, v. 157, p. 1-11, 2001.

HAYDEN, M.R.; TYAGI, S.C. Uric acid: a new look at an old risk marker for cardiovascular disease, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus: The urate redox shuttle. **Nutrition and Metabolism**, v.1, 2004. Disponível em: <<http://www.nutritionandmetabolism.com/content/1/1/10>> Acessado em: 10 dez 2005.

HORINEK, A.; VRABLIK, M.; CESKA, R.; ADAMKOVA, V.; POLEDNE, R.; HUBACEK, J.A. T-1131-->C polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridemic individuals. **Atherosclerosis**, v.167, n.2, p.369-370, 2003.

HOKANSON, J.E.; AUSTIN, M.A. Plasma triglyceride level is a risk factor for cardiovascular disease independent of high-density lipoprotein cholesterol level: a meta-analysis of population-based prospective studies. **J Cardiovasc Risk**, v. 3, p. 213-219, 1996.

ISSEMMANN, I.; GREEN, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. **Nature**, v. 347, p. 645-650, 1990.

KRAUSS, R.M. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. **Diabetes Care**, v.27, p.1496-1504, 2004.

LAHIRI, D.K.; NURNBERGER, J.J. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. **Nucleic Acid Research**, v. 19, p. 5444, 1991.

LAZAR, M.A. How obesity causes diabetes: not a tall tale. **Science**, v.307, p.373-375, 2005.

LEE, K.W.J.; AYYOBI, A.F.; FROHLICH, J.J.; HILL, J.S. APOA5 gene polymorphism modulates levels of triglyceride, HDL cholesterol and FER_{HDL} but is not a risk factor for coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.176, p. 165-172, 2004.

LEHTO, S.; NISKANEN, L.; RONNEMAA, T.; LAAKSO, M. Serum uric acid is a strong predictor of stroke in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Stroke**, v.29, p.635-639, 1998.

LEVY, A.P. Genetics of diabetic cardiovascular disease: identification of a major susceptibility gene. **Acta Diabetol.**, v.40, p.S330-333, 2003.

LI, G-P.; WANG, J-Y.; YAN, S-K.; CHEN, B-S.; XUE, H.; WU, G. Genetic effect of two polymorphisms in the apolipoprotein A5 gene and apolipoprotein C3 gene on serum lipids and lipoproteins levels in a Chinese population. **Clinical Genetics**, v. 65, p. 470-476, 2004.

LIU, H.; ZHANG, S.; LIN, J.; LI, H.; HUANG, A.; XIAO, C.; LI, X.; SU, Z.; CHUNTING, W.; NEBERT, D.W.; ZHOU, B.; ZHENG, K.; SHI, J.; LI, G.; HUANG, D. Association between DNA variant sites in the apolipoprotein A5 gene and coronary heart disease in Chinese. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.54, p.568-572, 2005.

MAEDA, N.; LI, H.; LEE, D.; OLIVER, P.; QUARFORD, S.H.; OSADA, J. Targeted disruption of the apolipoprotein C-III gene in mice results in hypotriglyceridaemia and protection from postprandial hypertriglyceridaemia. **J Biol Chem**, v. 269, p. 23610-23616, 1994.

MERKEL, M.; LOEFFLER, B.; KLUGER, M.; FABIG, N.; GEPPERT, G.; PENNACCHIO, L.A.; LAATSCH, A.; HEEREN, J. Apolipoprotein AV accelerates plasma hydrolysis of triglyceride-rich lipoproteins by interaction with proteoglycan-bound lipoprotein lipase. **J Biol Chem**, v.280, n.22, p.21553-21560, 2005.

MERKEL, M.; HEEREN, J. Give me A5 for lipoprotein hydrolysis! **J Clin Invest**, v.115, n.10 p.2694-2696, 2005

MILLER, M.P. **RxC**: A program for the analysis of contingency tables. 1997. Disponível em: <http://www.marksgeneticsoftware.net/_vti_bin/shtml.exe/rxc.htm> Acesso em: 01 nov 2005.

NABIKA, T.; NASREEN, S.; KOBAYASHI, S.; MASUDA J. The genetic effect of the apolipoprotein AV gene on the serum triglyceride level in Japanese. **Atherosclerosis**, v. 165, p. 201-204, 2002.

O'BRIEN, P.J.; ALBORN, W.E.; SLOAN, J.H.; ULMER, M.; BOODHOO, A.; KNIERMAN, M.D.; SCHULTZE, A.E.; KONRAD, R.J. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. **Clin Chem**, v.51, n.2, p.351-359, 2005.

OLIVIER, M.; WANG, X.; COLE, R.; GAU, B.; KIM, J.; RUBIN, E. M.; PENNACCHIO, L. A. Haplotype analysis of the apolipoprotein gene cluster on human chromosome 11. **Genomics**, v. 83, p. 912-923, 2004.

OLOFSSON, S.O. Apo A-V: the regulation of a regulator of plasma triglycerides. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.25, p.1097-1099, 2005.

PENNACCHIO, L. A.; OLIVIER, M.; HUBACEK, J. A.; COHEN, J. C.; COX, D. R.; FRUCHART, J-C.; KRAUSS, R.M.; RUBIN, E. M. An apolipoprotein influencing triglycerides in humans and mice revealed by comparative sequencing. **Science**, v. 294, p. 169-173, 2001.

PENNACCHIO, L. A.; OLIVIER, M.; HUBACEK, J.A.; KRAUSS, R. M.; RUBIN, E. M.; COHEN, J. C. Two independent apolipoprotein A5 haplotypes influence plasma triglyceride levels. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 24, 3031-3038, 2002.

PENNACCHIO, L. A.; RUBIN, E. M. Apolipoprotein A5, a newly identified agent that affects plasma triglyceride levels in humans and mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.23, n. 4, p. 529-534, 2003.

PHILLIPS, G.B.; PINKERNELL, B.H.; JING, T-Y. Are major risk factors for myocardial infarction the major predictors of degree of coronary artery disease in men? **Metabolism**, v.53, n.3, p.324-329, 2004.

PIEGAS, L.S.; AVEZUM, A.; PEREIRA, J.C.R.; ROSSI NETO, J.M.; HOEPFNER, C.; FARRAN, J.A.; RAMOS, R.F.; TIMERMAN, A.; ESTEVES, J.P. Risk factors for myocardial infarction in Brazil. **Am Heart J**, v. 146, p.331-338, 2003.

PLUMP, A. S.; SMITH, J.D.; HAYEK, T.; AALTO SETALA, K.; WALSH, A.; VERSTUYFT, J. G.; RUBIN, E. M.; BRESLOW, J. L. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. **Cell**, v. 71, p. 343-353, 1992.

PLUMP, A. S.; AZROLAN, N.; ODAKA, H.; WU, L.; JIANG, X.; TALL, A.; EISENBERG, S.; BRESLOW, J.L. ApoA-1 knockout mice : characterization of HDL metabolism in homozygotes and identification of a post-RNA mechanism of apoA-1 up-regulation in heterozygotes. **J Lipid Res**, v. 38, n. 5, p. 1033-1047, 1997.

PPAR Signaling Pathway. Disponível em:
<http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Signaling/Scientific_Resources/Pathway_Slides_Charts/PPAR_Signaling_Pathway.html>. Acesso em: 10 set 2004.

PRIEUR, X.; COSTE, H.; RODRÍGUEZ, J. C. The human apolipoprotein AV gene is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor- α and contains a novel farnesoid X-activated receptor response element. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278. n. 28, p. 25468-25480, 2003.

REAVEN, G.M. Syndrome X: 6 years later. **J Intern Med Suppl**, v.736, p.13-22, 1994.

RIBALTA, J.; FIGUERA, L.; FERNANDEZ-BALLART, J.; VILELLA, E.; CASTRO, M.C.; MASANA, L.; JOVEN, J. Newly identified apolipoprotein AV gene predisposes to high plasma triglycerides in familial combined hyperlipidemia. **Clin Chem**, v.48, n.9, p.1597-1600, 2002.

RIFAI, N.; BACHORIK, P. S.; ALBERS, J. J. Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. *In*: BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz textbook of clinical chemistry**. 3 ed. Philadelphia: Saunders, 1999. p.809-861.

ROSEGREN, A.; WELIN, L.; TSIPOGIANNI, A.; WILHELMSEN, L. Impact of cardiovascular risk factors on coronary heart disease and mortality among middle age diabetic men. A general population study. **BMJ**, v.299, p.1127-1131, 1989.

SCHAAP, F.G.; RENSEN, P.C.; VOSHOL, P.J.; VRINS, C.; VAN DER VLIET, H.N.; CHAMULEAU, R.A.; HAVEKES, L.M.; GROEN, A.K.; VAN DIJK, K.W. ApoAV reduces plasma triglycerides by inhibiting very low density lipoprotein-triglyceride production and stimulating lipoprotein lipase-mediated VLDL-TG hydrolysis. **J Biol Chem**, v.279, n.27, p.27941-17947, 2004.

SCHOONJANS, K.; PEINADO-ONSURBE, J.; LEFEBVRE, A. M.; HEYMAN, R. A.; BRIGGS, M.; DEEB, S.; STAELS, B.; AUWERX, J. PPAR α and PPAR γ activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene. **EMBO J**, v. 15, p. 5336-5348, 1996.

SEDA, O.; SEDOVÁ, L. New Apolipoprotein A-V: Comparative genomicx meets metabolism. **Physiol Res**, v.52, p.141-146, 2003.

SHARMA, A.M. Obesity and cardiovascular risk. **Growth Hormone & IGF Research**, v.13, p.S10-S17, 2003.

SHIMOKATA, K.; YAMADA, Y.; KONDO, T.; ICHIHARA, S.; IZAWA, H.; NAGATA, K.; MUROHARA, T.; OHNO, M.; YOKOTA, M. Association of gene polymorphisms with coronary artery disease in individuals with or without nonfamilial hypercholesterolemia. **Atherosclerosis**, v.172, p.167-173, 2004.

SORCI-THOMAS, M.G.; PRACK, M M.; DASHTI, N.; JOHNSON, F.; RUDEL, L.L.; WILLIAMS, D.L. Differential effects of dietary fat on the tissue-specific expression of the apolipoprotein A-I gene: relationship to plasma concentration of high density lipoproteins. **J Lipid Res**, v. 30, p. 1397-1403, 1989.

SOWERS, J.R. Diabetes mellitus and cardiovascular disease in women. **Arch Intern Med**, v.158, p.617-621, 1998.

STAELS, B.; VU-DAC, N.; KOSYKH, V.A.; SALADIN, R.; FRUCHART, J.C.; DALLONGEVILLE, J.; AUWERX, J. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. **J Clin Invest**, v. 95, p. 705-712, 1995.

STAMLER, J.; VACCARO, O.; NEATON, J.D.; WENTWORTH, D. Diabetes and other risk factors – 12 year cardiovascular mortality from the Multiple Risk Factor Intervention Trial. **Diabetes Care**, v.16, p.434-444, 1993.

SWANEY, J.B.; BRAITHWAITE, F.; EDER, H.A.. Characterization of the apolipoprotein of rat plasma lipoproteins. **Biochemistry**, v.16, p.271-278, 1977.

SZALAI, C.; KESZEI, M.; DUBA, J.; PROHÁSZKA, Z.; KOZMA, G.T.; CSÁSZÁR, A.; BALOGH, S.; ALMÁSSY, Z.; FUST, G.; CZINNER, A. Polymorphism in the promoter region of the apolipoprotein A5 gene is associated with an increased susceptibility for coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 173, p. 109-114, 2004.

TAKAISHI, H.; TANIGUCHI, T.; FUJIOKA, Y.; ISHIKAWA, Y.; YOKOYAMA, M. Impact of increasing diabetes on coronary artery disease in the past decade. **J. Atheroscler Thromb**, v.11, p.271-277, 2004.

TALL, A.; JIANG, X.; LUO, Y.; SILVER, D. 1999 George Lyman Duff Memorial Lecture: lipid transfer proteins, HDL metabolism and atherogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v.20, p.1185-1188, 2000.

TALMUD, P.J.; HAWES, E.; MARTIN, S.; OLIVIER, M.; MILLER, G.J.; RUBIN, E.M.; PENNACCHIO, L.A.; HUMPHRIES, S.E. Relative contribution of variation within the APOC3/A4/A5 gene cluster in determining plasma triglycerides. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 24, p. 3039-3046, 2002.

TALMUD, P. J. APOA5 – a recent addition to genes determining plasma triglycerides. **International Congress Series**, v. 1253, p. 79-84, 2003.

TALMUD, P.J.; MARTIN, S.; TASKINEN, M-R.; FRICK, M.H.; NIEMINEN, M.S.; KESÄNIEMI, Y.A.; PASTERNAK, A.; HUMPHRIES, S.E.; SYVÄNNE, M. APOA5 gene variants, lipoprotein particle distribution, and progression of coronary heart disease: results from the LOCAT study. **J Lipid Res**, v.45, p.750-756, 2004.

TAN, C.E.; CHEW, L.S.; CHIO, L.F.; TAI, E.S.; LIM, H.S.; LIM, S.C.; JAYAKUMAR, L.; ENG, H.K.; PACKARD, C.J. Cardiovascular risk factors and LDL subfraction profile in type 2 diabetes mellitus subjects with good glycaemic control. **Diabetes Res Clin Pract**, v.51, p.107-114, 2001.

TEMELKOVA-KURKTSCHIEV, T.; HANEFELD, M. The lipid triad in type 2 diabetes – prevalence and relevance of hypertriglyceridaemia/ low high-density lipoprotein syndrome in type 2 diabetes. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, v.112, p.75-79, 2004.

TRIGATTI, B.; RIGOTTI, A.; KRIEGER, M. The role of high-density lipoprotein receptor SR-B1 in cholesterol metabolism. **Curr Opin Lipidol**, v.11, p.123-132, 2000.

VAN DER VLIET, H.N.; SAMMELS, M.G.; LEEGWATER, A.C. J.; LEVELS, J.H.M.; REITSMA, P.H.; BOERS, W.; CHAMULEAU, R.A.F.M. Apolipoprotein A-V. A novel apolipoprotein associated with early phase of liver regeneration. **J Biol Chem**, v. 276, n. 48, p. 44512-44520, 2001.

VOGEL, F.; MOTULSKY, A.G. **Human genetics: problems and approaches**. 3^a ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 851 p.

VRABLÍK, M.; HORÍNEK, A.; CESKA, R.; ADÁMKOVÁ, V.; POLEDNE, R.; HUBACEK, J.A. Ser 19→Trp polymorphism within the apolipoprotein AV gene in hypertriglyceridaemic people. **J Med Genet**, v.40, p. e105, 2003.

VU-DAC, N.; GERVOIS, P.; JAKEL, H.; NOWAK, M.; BAUGÉ, E.; DEHONDT, H.; STAELS, B.; PENNACCHIO, L.A.; RUBIN, E.M.; FRUCHART-NAJIB, J.; FRUCHART, J-C. Apolipoprotein A5, a crucial determinant plasma triglyceride levels, is highly responsive to peroxisome proliferator-activated receptor α activators. **J Biol Chem**, v. 278. n. 20, p. 17982-17985, 2003.

WEINBERG, R.B.; COOK, V.R.; BECKSTEAD, J.A.; MARTIN, D.D.O.; GALLAGHER, J.W.; SHELNESS, G.S.; RYAN, R.O. Structure and interfacial properties of human apolipoprotein A-V. **J Biol Chem**, v.278, n.36, p.34438-34444, 2003.

WHO – World Health Organization. The World Health Report, 2004. Disponível em: <http://www.who.int/whr/2002/en/whr2002_annex2.pdf> Acesso em: 27 jun 2004.

WILSON, P.W.; CUPPLES, L.A.; KANNEL, W.B. Is hyperglycemia associated with cardiovascular disease? The Framingham Study. **Am Heart J**, v.121, p.586-590, 1991.

WRIGHT, W.T.; YOUNG, I.S.; NICHOLLS, D.P. PATTERSON, C.; LYTTLE, K.; GRAHAM, C.A. SNPs at the *APOA5* gene account for the strong association with hypertriglyceridaemia at the *APOA5/A4/C3/A1* locus on chromosome 11q23 in the Northern Irish population. **Atherosclerosis**, v.185, p.353-360, 2005.

YOLOGLU, S.; SEZGIN, A.T.; SEZGIN, N.; OZDEMIR, R.; YESILADA, E.; TOPAL, E. Determination of risk factors in obese and non-obese patients with coronary artery disease. **Acta Cardiol**, v.60, n.6, p.625-629, 2005.

YOO, T.W.; SUNG, K.C; SHIN, H.S.; KIM, B.J.; KIM, B.S.; KANG, J.H.; LEE, M.H.; PARK, J.R.; KIM, H.; RHEE, E.J.; LEE, W.Y.; KIM, S.W.; RYU, S.H.; KEUM, D.G. Relationship between serum uric acid concentration and insulin resistance and metabolic syndrome. **Circ J**, v.69, p. 928-933, 2005.

ANEXOS

ANEXO I - VALORES DE REFERÊNCIA PARA O PERFIL LIPÍDICO PARA ADULTOS ACIMA DE 20 ANOS

Lípides	Valores de referência (mg/dL)	Categoria
Colesterol Total	< 200	Ótimo
	200 – 239	Limítrofe
	≥ 240	Alto
LDL-C	< 100	Ótimo
	100 – 129	Desejável
	130 – 159	Limítrofe
	160 – 189	Alto
	≥ 190	Muito alto
HDL-C	< 40	Baixo
	> 60	Alto
Triglicérides	< 150	Ótimo
	150 – 200	Limítrofe
	200 – 499	Alto
	≥ 500	Muito alto

FONTE: III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias. **Arq Bras Cardiol**, v. 77 (Supl. III), p. 43, 2001.

ANEXO II - FATORES DE RISCO PARA DOENÇA ARTERIAL CORONARIANA

- Idade: ♂ ≥ 45 anos, ♀ ≥ 55 anos
- Sexo: masculino
- Histórico familiar
- Tabagismo
- Hipertensão arterial (≥ 140/90 mmHg)
- LDL-C ≥ 160 mg/dL
- HDL-C < 35 mg/dL
- Diabetes melito
- Hipertrigliceridemia

FONTE: III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias. **Arq Bras Cardiol**, v. 77 (Supl. III), p. 43, 2001.

ANEXO III - VALORES DE GLICOSE PLASMÁTICA (mg/dL) PARA DIAGNÓSTICO DO DIABETE MELITO E SEUS ESTÁGIOS PRÉ-CLÍNICOS

Categoria	Jejum*	2 horas após 75 g de glicose	Casual **
Glicemia normal	< 100	< 140	
Tolerância à glicose diminuída	≥ 100 a < 126	≥ 140 a < 200	
Diabete melito	≥ 126	≥ 200	≥ 200 com sintomas clássicos***

*O jejum é definido como falta de ingestão calórica por no mínimo 8 horas.

**Glicemia plasmática casual é definida como aquela realizada a qualquer hora do dia, sem se observar o intervalo desde a última refeição.

***Os sintomas clássicos de diabete melito incluem poliúria, polidipsia e perda inexplicada de peso.

Nota: O diagnóstico de diabete melito deve sempre ser confirmado pela repetição do teste em outro dia, a menos que haja hiperglicemia inequívoca com descompensação metabólica aguda ou sintomas óbvios de diabete melito.

FONTE: American Diabetes Association. Diagnosis and classification of Diabetes mellitus. Diabetes Care, 28:S37-S42, 2005.

ANEXO IV – FICHA DE COLETA DE DADOS DO PACIENTE

Caracterização do Paciente	Nº registro interno	Data
Nome:		____/____/____

Dados clínicos

N	Dados	Observações
1	Sexo	(1) = Masculino (2) = Feminino
2	Idade	[] anos
3	Peso	[] kg
4	Altura	[] cm
5	IMC	Não preencher
6	Pressão Arterial (PA)	[] / [] mmHg
7	Tabagismo	(1) = Nunca fumou (2) = Ex-fumante (3) = Fumante
8	Diabete melito	(1) = Sim (2) = Não Tipo do diabetes: (1) = Tipo 1; (2) = Tipo 2; (3) = outro Tempo do diagnóstico do Diabete melito: [] anos
09	História familiar de Doença Arterial Coronária (DAC)	Pelo menos um parente de primeiro grau foi diagnosticado com DAC até os 55 anos (homens) ou até 65 anos (mulheres) (1) = Sim; (2) = Não
10	História clínica	Insuficiência Renal: (1) = Sim (2) = Não Tempo da doença: [] anos Infarto: (1) = Sim (2) = Não Tempo de ocorrência do evento: []/(meses) ou (anos) Anotar outros dados relevantes:
11	Dados do cateterismo	Não é necessário preencher

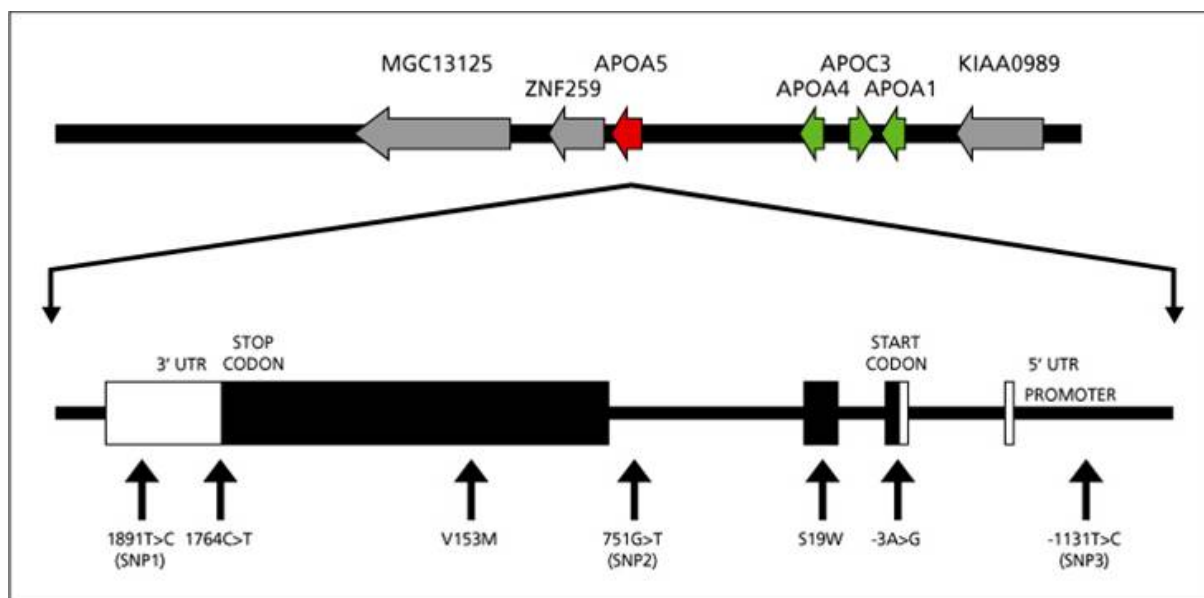
ANEXO V – VALORES DE REFERÊNCIA PARA ANÁLISES LABORATORIAIS

ANALITOS	MNEMÔNICO	VALORES DE REFERÊNCIA	REFERÊNCIAS
Hemoglobina Glicada A_{1c} (%)	HbA _{1c}	4,5 – 6,5%	Bio Rad – Variant (HPLC)
Glicose (mg/dL)	GLU	60 - 99	American Diabetes Association, 2005.
Colesterol total (mg/dL)	COL	Desejável < 200 Limítrofe 200 - 239 Elevado > 240	III Diretrizes Brasileiras em Dislipidemias, 2001.
HDL-colesterol (mg/dL)	HDL-c	> 40 > 45 (diabéticos) > 60 alto (desejável)	
LDL-colesterol (mg/dL)	LDL-C	< 100 Ótimo 100 – 129 Desejável 130 – 159 Limítrofe 160 – 189 Alto ≥ 190 Muito alto	
Triglicérides (mg/dL)	TG	< 150 Ótimo 150 – 200 Limítrofe 200 – 499 Alto ≥ 500 Muito alto	
Apolipoproteína A1 (mg/dL)	apoA1	♂ 104 - 202 ♀ 108 - 225	
Apolipoproteína B (mg/dL)	apoB	♂ 66 – 133 ♀ 60 - 117	Roche Diagnóstica – Hitachi 917
Ácido úrico (mg/dL)		♂ 3,5 – 7,5 ♀ 2,5 – 6,5	

ANEXO VI - SEQUÊNCIA DE BASES DO GENE DA APOLIPOPROTEÍNA A-V.

Retirado do GenBank nº AY422949

Sentido 5' → 3'



FONTE: OLIVIER et al., 2004.

```

ctactcagtttgattcagctatgaccctttcagacatggtccaaatgagagtcacgccag
gcaaacttctatcataaacatctatttcatttgagccagaagtctaggcttcaacttggg
aaccagaggggaggggctggagatggggagagcacacagtatgctccccagaggggttaa
ggagctcccacagttgggaggggttcagtccttatttaggtgtagagctatgtcaggaaa
catgggctctgcccctctcctatcacagcccacacctttcgtaccaccagcatcagagcc
agcaggggatattcacacaccatcacatgttctcccatgatattctctttctcccttcta
ttcccttgatagctgccatggcagccctggggagacaagtgtcctctctgtggaccagc
tgtagcagtggccaccagggcagccagaagtgactagagccaaactccaggatgtagtggc
acaggcttcagcatcacggcaaacaggcttgagataatcacccacatgcatggtgct
ctccctccctactccctcacccttgaatggagtaactcatgagcattcccaaagtagcac
tgggaggttgggttgcaaagcctgggtgaatgtaatgcatccagattggggagtcgcagg
aggctggatatgcaggagacagcagccctttgggtggcctccctgtcctgcacaggacct
tccaccctccaccaacaggccactttcaaggactgaaccatgctagaggctcagagcca
aggctccccagacaaggagctgggaatgggcctgggcaggtagatcctcaggggtcccc
agatggctgtggccctgggtcatgaaggctgtgagtgatgtcttccacaggtcatccaga
cgggctgagcttgtcagaaccttgccactgtctgtttgttgaaactctggggcgaaag
gcactgtggcctgggtggaggtggcgccagctgctgctggacctcctcagtcctctggtcg
atggcgagtgaggaaggcagctatctgcaggtagggtgtcctggcgaaagcctgaagtcgc
tggcgcacctcctcggagagcatctgggggtccgggcccggcccttctcagtcacagtg
cctgcaaaggctctgctgagctcttcgcgcagctgggtccaggttctgctggatgctgctg
tgcagggccttggccttgagcgtgagcttccgggagagcacctgcacgcagcagctgagg
cgcgcgggggtggcgggggcgtgaggagccacactgcgggtgcagctcctgcacgtggcgc
ccgatgccgctcaccaggctctcggcgtatgggtggaagagctctttgaagcgccgggtg
tgggtgcaccacgcggctctgcagtccttgcagcaaaagcccaagcctcgtccacgcccc
agcaactgggccttgggtgtcttccccaccacgcgcaactgctcctgcagctcctgcag
cgcagggccacctgctccatcagatccatcgtgtagggttcagttgctgcccgaagccc
tccaaattccagcccaccagctcgtgcgcctctgccatgtagggtggaggcagccttc
acctcctccaactcctcctgcagctgccgccgcatgccaccgggtcctgtgggagccga
ggagcctcgctcccactcagaggcctcagcttttccaggaaacttggtcatattgttgagg
    
```

tcttgc tcaaggctgtctttcagggctcctggagaaggggacagatatccaggccgtcaga
 ctgctagcccccatcatctcctttgtccccaagtcacgcgcactgatcctctgggggaa
 ccaaggacgcagggcggttgccccagggctcgagggctcttgtcctagccctggccagtaa
 caactcacgcacgaagcacaacacattgcccatacaaattccagacctacaacactctcc
 aaagaaacatagatgcgccacatcatcctttgattctggggactgcagcgggctcctcc
 cgattgatcccagggtcccgcgcctcagtgagcaagggggcaacagctacggagtgtcaa
 ggcgggggctgcaggcagagggcgctaaagagcccaggatggccgggatctgcagacaga
 gctagcaccgctcctttcctctgtcccagcagcggccacagaggttgaggcagcagaggc
 aggtcatcatggcatggcccagctgtctcctcccttcgcctacaccccttcccttgggca
 ctacgcgggctcgcgagccatcttctgctgatggatctgctccaccctgcctttgtccc
 cgctggctctggctgaagtagtcccagaa

Polimorfismo S19W: oligonucleotídeos iniciadores identificados na região sublinhada.

F 5' GGCTCTTCTTTTCAGGTGGGTCTCCG 3';

R 5' GCCTTTCCGTGCCTGGGTGGT 3' [a timina (T) no iniciador induz a criação de sítio de restrição (identificado por seta) para enzima *Taq* I].

↓

gcctttccgtgcctgggtggccgaaaacgctg

tggagagggactaggtaatcagggcctgggctctcctccccaggggtggacagggccctc
 tggccagcctccacccacacccccacgcttgaagtcagggctcgagaccacctgaaagaa
gagcc

agagcccagggtgagcacggcagccatgcttgccattatctgctctgagaagacag
 gtggagggaggcctgggttaggggaagaaggagacgaagggacatggcgcaggggacttgc
 ccagggggcctctgcaggggcaactgcccgaatcctgttacccttcccttgggctgggg
 agcacagagctgttggggctcaagaggactgacctaggtgagtcaaggaggctaggggtgt
 ctccctcagacatgggaagaggcgctgtcttctacctcagtcacatagcagggagcgt
 ggtgctctaacccttcgcaaagggtcccagacccaggaacagttctctagggcacttct
 accacctctccctgcccacctgtctccctccctccatttcatggtggaaaaactgagc
 cataatgagggcgaagaggcaactctgccccaaatgttccaagaggagctcttaggggcca
 cccagggctctccctgagggccacctgcaatgccctcccttaggactgtgaccccatcc
 ctctgcccagctgctcacctgctcacgtctgggcacagagagcagacattctgctttat
 actccagggccctgagcctctggccaccaattgctctgagtaaataccacgtggaagttca
 aaagaagttgacctcagctgcctcccagcactcacctcctgccctttccctggcaccag
 aggggttaatgagtgcctgggtatcaggggctgccccagtagagaaagtgttcccaggagc
 tttaacgggggatggggctgaactcctcaccagtttctccaaaccccatgaccttaac
 ctccactgacctgctgggtggcccaccaacagagaagaacctgttctgccaaggg
 cccctctcttacacaactaccagagtcactgtgtcccagccggcaagatggacagtggt
 caccaccagccagaacccgagcagccctgaaagcttactacaggttccgcagggcatc
 ctacgcagcattcataggggttaaagaccaaccacatccctctttatgaaacaatcctgg
 aacaagcaaggggaagccagggcaggggtgaagatgagatggcaagaggcatctgggcccagg
 actctgag

Polimorfismo -1131T>C . oligonucleotídeos iniciadores marcados com duplo sublinhado

F 5' GGAGCTTGTGAACGTGTGTATGAGT 3';

R 5' CCCAGGAACTGGAGCGAAAT 3' [a timina (T) introduzida no iniciador induz a criação de sítio de restrição (identificado por seta) para a enzima *Mse* I].

↓

cccaggaactggagcgaaagt aagatttgccccatgaggaaaagctgaact
 ccactcgcagggcctctgaggagagcaagcccaaatgctcagatcttctctgatgacaca
 cccactccgtctacagtactcatacacacggttcacaagctcc
 cgattcttggctcctaaat

gcattcttgaatcaatccctctcctccatttccactaccatcattgcaccagttgtctgt
 caccttgattgcattcatagcctccaacaggtctttctaccacactcctgcccatttaac
 tcatcctccactgtgggtcatcctgactcatttccagtctcatctgctgccacataaaac
 cacagcattccctgagcctttatacagggctccctctgcttgaaatagcctatcccttg
 tgaatatatatattcatttttttagagttagtttgtattagttagaattagacttgggtgcaa
 gggacatatatatgt